



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

LUANA MESQUITA DA SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ SILVESTRE (*Oryza glumaepatula* Steud)
NO ESTADO DE RORAIMA**

BOA VISTA
RORAIMA - BRASIL
2010

LUANA MESQUITA DA SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ SILVESTRE (*Oryza glumaepatula* Steud)
NO ESTADO DE RORAIMA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal.

Orientado: Pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli

Boa Vista
Roraima - Brasil
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

S586b Silva, Luana Mesquita da.

Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas em arroz silvestre (*Oriza glumaepatula* Steud) no Estado de Roraima / Luana Mesquita da. – Boa Vista, 2010.

58 f.

Orientador: Prof. Dr. Jerri Édson Zilli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1 – Arroz Silvestre. 2 – FBN. 3 – Amazônia. 4 – recurso genético. 5 – ácido indol acético e solubilização de fosfato. I - Título. II – Zilli, Jerri Édson (orientador).

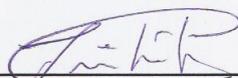
CDU – 631.461

LUANA MESQUITA DA SILVA

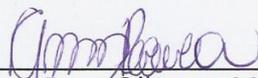
Isolamento e Caracterização de Bactérias Diazotróficas em Arroz Silvestre (*Oryza glumaepatula* Steud) no Estado de Roraima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal.

Aprovada: 25 de maio de 2010



Pesquisador – Dr. Jerri Édson Zilli
Orientador – Embrapa Roraima



Dra. Gilmara Maria Duarte Pereira
Bolsista - PRODOC/CAPES/UFRR



Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior
Bolsista -PNPD/CAPES/UFRR



Dr. Antonio Carlos Centeno Cordeiro
Pesquisador - Embrapa Roraima

DEDICATÓRIA

A Deus, pela oportunidade realizar mais um sonho e ter me ajudado a superar todas as dificuldades que surgiram ao longo de toda esta caminhada;

À minha filha Luna da Silva Mano e meu esposo Wenderson Aragão Mano, pela ausência durante o processo de aprendizagem;

À minha mãe Maria Cléia da Silva, pelo apoio que sempre foi me dado nos estudos;

Em memória de minha avó Maria Mercedes Mesquita da Silva, que muitas vezes deixei de visitar para me empenhar neste trabalho e pelo orgulho visto em seus olhos ao ver-me empenhada nos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Jerri Édson Zilli e minha co-orientadora Liamara Perin não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, pela paciência e confiança;

À CAPES, pela concessão do programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal de Roraima;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal de Roraima pela oportunidade da conquista deste novo patamar acadêmico, enriquecendo minha vida profissional;

Ao CNPq pelo apoio financeiro que viabilizou a condução deste trabalho;

Aos bons professores deste curso que me ajudaram nesta capacitação;

Às minhas amigas do mestrado que choraram e sorriram junto a mim durante todos os acontecimentos que surgiram;

Aos meus irmãos e minha cunhada por estarem sempre ao lado da minha filha em minha ausência;

Agradeço também aos professores do Departamento de Biologia em especial minha amiga Núbia Abrantes que sempre me fez acreditar que era capaz;

À Embrapa Roraima pela concessão da estrutura e materiais que possibilitaram a execução dos experimentos;

A todos os técnicos da Embrapa/RR em especial a Aliny Maria de Melo e Giovanni Ribeiro de Souza, pelo carinho e atenção que sempre me foi dedicada.

*“O futuro pertence aqueles que acreditam na
beleza de seus sonhos”*

Eleonor Roosevelt

SILVA, Luana Mesquita da. Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas em arroz silvestre (*Oryza glumaepatula* (Steud) no Estado de Roraima. 2010. f. Dissertação de Mestrado / Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.

RESUMO

Espécies de arroz silvestre são colonizadas por bactérias diazotróficas, contudo, pouco se conhece sobre a colonização em *Oryza glumaepatula* (Steud). Este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias diazotróficas de arroz silvestre em áreas de mata e cerrado no bioma amazônico. Amostras de plantas selvagens foram coletadas e utilizadas para o isolamento bacteriano, sendo as bactérias obtidas avaliadas quanto à formação de película em meio de cultura semi-sólido. Posteriormente, as que apresentaram a formação de película foram analisadas quanto a presença do gene *nifH* utilizando os iniciadores PolF/PolR e, as que foram positivas, caracterizadas através de Box-PCR, solubilização de fosfato de Ca e produção de ácido indol acético (AIA). Trinta e oito bactérias, cerca de 4% do total, formaram película e apresentaram produto de amplificação do gene *nifH*. A incidência de bactérias diazotróficas foi semelhante entre as áreas, porém maior número foi isolado na parte aérea das plantas. Além disso, mais de 30% das bactérias diazotróficas apresentaram produção de AIA e/ou solubilização de fosfato, sendo a maior concentração na parte aérea das plantas do cerrado. Nessa área ocorre maior diversidade genotípica de bactérias diazotrófica associadas ao arroz silvestre e maior número destas bactérias capazes de solubilizar fosfato de Ca e produzir AIA.

Palavras-chave: arroz silvestre, FBN, Amazônia, recurso genético, ácido indol acético e solubilização de fosfato de cálcio.

SILVA, Luana Mesquita da. Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas em arroz silvestre (*Oryza glumaepatula* (Steud) no Estado de Roraima. 2010. 59f. Dissertação de Mestrado / Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.

ABSTRACT

Species of wild rice are colonized by diazotrophic bacteria, however, little is known about the colonization in *Oryza glumaepatula* (Steud). This study aimed isolate and characterize diazotrophic bacteria of the wild rice from forest and cerrado areas in the Amazon biome. Samples of wild plants were collected for bacterial isolation, and semi-solid medium was used to assay the pellicles formation by the bacteria. Later, the *nifH* gene was also amplified by PCR using the primer set PolF/PolR and the bacteria, each one was positive, characterized through Box-PCR, solubilization of calcium phosphate and production of indol acetic acid (AIA). Thirty eight bacteria, around 4% of the total, formed pellicles and also presented *nifH* gene amplification. A incidence of diazotrophic bacteria was similar between the areas, however, higher number was isolated from the aerial part of the plants. Furthermore, more than 30% of the diazotrophic bacteria produced AIA and/or solubilized phosphate, and the largest concentration of these bacteria was isolate in the aerial part of the plants from cerrado. In this area happens higher genotypic diversity of diazotrophic bacteria associated to the wild rice and also the larger number of these bacteria is capable producing AIA and solubilizing phosphate.

Key-words: wild rice, BNF, Amazon, genetic resource, indol acetic acid, calcium phosphate solubilization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	14
2.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	15
2.3. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO	19
2.4. PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA).....	21
2.5. A CULTURA DE ARROZ.....	23
2.6. ARROZ SILVESTRE <i>Oryza glumaepatula</i> (Steud)	25
3. ARTIGO: Ocorrência de bactérias diazotróficas em arroz silvestre (<i>Oryza glumaepatula</i>) em áreas amazônicas	27
3.3. INTRODUÇÃO	28
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4. CONCLUSÕES	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
APÊNDICES	52
APÊNDICE A – Área de Cerrado	53
APÊNDICE B – Área de Mata.....	54
APÊNDICE C – Repicagem para o isolamento em meio Dyg's.....	54
APÊNDICE D – Diversidade de Cores dos Isolados	55
APÊNDICE E – Halo formado pela solubilização de fosfato de cálcio.....	55
ANEXOS	56
ANEXO A - MEIO DE CULTURA DYGS.....	57
ANEXO B - SOLUÇÃO SALINA PARA DILUIÇÃO.....	57
ANEXO C - MEIO DE CULTURA BMGM	57
ANEXO D - SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO.....	58
ANEXO E - METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AIA (Ácido Indol Acético)	59
ANEXO F - TAMPÃO TBE 10 X	59

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA	PÁGINA
3.1. Localização das áreas, análise do solo, unidades formadoras de colônia, número de isolados bacterianos totais e número de isolados diazotróficos obtidos a partir de plantas de arroz selvagem coletadas em área de mata e cerrado no Estado de Roraima.....	32
3.2. Número de isolados bacterianos totais e diazotróficos e incidência de bactérias diazotróficas em plantas de arroz silvestre coletadas em área de mata e cerrado no Estado de Roraima.....	33
3.3. Produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) por isolados bacterianos diazotróficos oriundos de plantas de arroz silvestre coletadas em área de mata e cerrado em Roraima.....	39
3.4. Percentagem de isolados diazotróficos obtidos de arroz silvestre em cada grupo genotípico, o qual se baseou na análise de Box-PCR (Figura 1). Os números entre parêntese indicam o número de isolados bacterianos.....	40
FIGURA	PÁGINA
3.1. Amplificação do gene <i>nifH</i> com iniciadores PolR e PolF da estirpe BR 11001 (linhas 2, 3 e 4 com as temperaturas de anelamento de 55, 59 e 62°, respectivamente), ERR 1020 (linhas 5, 6 e 7 com as temperaturas de anelamento de 55, 59 e 62°, respectivamente) e ERR 1027 (linhas 8, 9 e 10 com as temperaturas de anelamento de 55, 59 e 62°, respectivamente). Linha 1 e 12 marcador de peso molecular e 11 controle negativo.....	34
3.2. Dendrograma de bactérias diazotróficas oriundas de arroz silvestre elaborado a partir da amplificação por PCR com iniciadores para elementos Box. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Pearson.....	37

1. INTRODUÇÃO

Dentre os nutrientes requeridos pelas plantas, o nitrogênio é considerado o mais problemático no solo, pois sua disponibilidade depende da matéria orgânica, a qual é escassa na maioria dos solos tropicais. Nas plantas, por outro lado, o N é o quarto elemento mais abundante, sendo superado apenas pelo carbono, oxigênio e hidrogênio. É um dos constituintes essenciais de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A baixa disponibilidade de nitrogênio dos solos é responsável, em grande parte, pelos baixos níveis de rendimento das culturas, uma vez que a aplicação de fertilizantes pode ser limitante face aos altos custos deste insumo (CAMPOS et al., 2003).

Existem bactérias que habitam naturalmente o interior e exterior de órgãos vegetais e podem ser benéficas para os vegetais. Dentre elas podem ser destacadas as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) que residem nos vegetais na forma epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos e em pós-colheita (MARIANO et al., 2004).

Dentre as formas de promoção de crescimento vegetal, a fixação biológica do N_2 (FBN) representa um dos mais importantes mecanismos, pois através deste é possível disponibilizar nitrogênio às plantas. Os microrganismos realizam a FBN através do complexo enzimático conhecido como nitrogenase, a qual é capaz de promover a reação de quebra dos átomos de nitrogênio à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia de processos foto e quimiossintéticos, ou obtidas a partir de carboidratos (provenientes da fermentação ou respiração) e armazenada sob a forma de ATP (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os microrganismos fixadores de nitrogênio possuem uma grande diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética. Essa diversidade garante a resiliência da FBN nos ecossistemas e ocorrência deste processo nos mais diferentes habitats terrestres (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A promoção de crescimento pode ser direta, na qual o microrganismo atua diretamente no desenvolvimento da planta, e indireta quando a planta está sendo infectada por um patógeno e as BPCP atuam como agentes de controle biológico através da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço, Fe⁺³ e outros nutrientes, parasitismo e indução de resistência. As principais BPCP são encontradas entre os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*; *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Azospirillum* e *Burkholderia*, entre outros (MARIANO et al., 2004).

Devido ao seu benefício, houve um crescente interesse no estudo da ocorrência do potencial de colonização e da utilização de bactérias para promoção de crescimento. Entre as bactérias promotoras associadas a plantas de arroz, já foram isolados e observados com ampla ocorrência, tanto na rizosfera como o interior das plantas, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia kururiensis* e *B. vietnamiensis* (BALDANI; BALDANI, 2005). Outras bactérias diazotróficas também foram isoladas, porém com ocorrência restrita, como os gêneros *Sphingomonas* (EVIDETRA et al., 2009) no Brasil, *Serratia* (TAN et al., 2001) nas Filipinas, *Azospirillum irakense* e *A. oryzae*, isoladas de arroz no Iraque (KHAMMAS et al., 1989) e Japão (XIE et al., 2005), *Derxia* spp., isolada da espécie *Oryza perenne* coletada em várzea em Belém, no estado do Pará (MAGALHÃES, 1981) e espécies de *Azoarcus* foram isoladas em associação com arroz no Japão, sendo mais comum em espécies de arroz selvagem e variedades antigas de *Oryza sativa* (ENGELHARD et al., 2000).

O arroz é um dos cultivos de maior importância para a alimentação das populações nos países. Até o início da década de 90 apenas 3% da produção mundial de arroz era exportada. Em 2007, 5% do arroz produzido foi transacionado internacionalmente, ou seja, apesar do aumento da taxa de exportação, o arroz ainda é uma cultura predominantemente consumida nos próprios países produtores (FAO, 2009). Os maiores produtores mundiais de arroz são China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Tailândia, Vietnã, Myanmar, Japão e Brasil. No entanto, a produção cresceu mais no Vietnã, na Indonésia e em Myanmar. (SOUZA et al., 2010). No Brasil é cultivado em quase todos os estados e segundo a CONAB (2010) a estimativa é que sejam cultivados aproximadamente três milhões de hectares.

Em Roraima segundo Braga et al. (2009) o arroz é uma das principais culturas plantadas no Estado com influência direta na geração de emprego ao longo da cadeia produtiva, além deste cereal ser importante na dieta da população de Boa Vista.

Portanto, a avaliação da diversidade de bactérias diazotróficas presentes nos tecidos, nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta em especial do arroz, pode ajudar a compreender o papel desses microrganismos em seu habitat natural. Desta forma esse trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar bactérias diazotróficas promotoras de crescimento em arroz silvestre no estado de Roraima, visando estruturar uma coleção de microrganismos com potencial biotecnológico na agricultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1 % dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura é atribuída as descobertas recentes na área da biologia molecular de microrganismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se uns dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimentos, saúde, meio ambiente e indústria vem crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (OLIVEIRA et al., 2006).

Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal incluem ações diretas como a fixação biológica de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento vegetal, solubilização de fosfato inorgânico e ações indiretas, como o controle biológico, produção de sideróforos e aleloquímicos, indução de resistência local e sistêmica. O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) na biotecnologia tem se intensificado, incluindo a produção de antibióticos e outras moléculas bioativas, aplicação nos processos de biorremediação e nas técnicas de transgenia (OLIVARES, 2009).

Bactérias promotoras de crescimento, conhecidas na literatura como “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR) ou “rhizobacteria promotora de crescimento de plantas” (RPCP), colonizam diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, podendo promover aumentos na taxa de germinação de sementes, no desenvolvimento de órgãos, na produção de flores e no rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (AMORIM; MELO, 2002; DEY et al., 2004).

Naturalmente as bactérias colonizam o interior e exterior de órgãos de plantas, podendo ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) vivem em simbiose ou associadas com plantas e seus

benefícios podem ser observados em plantas propagadas “*in vitro*” e “*in vivo*”. Entre os benefícios das BPCP estão o aumento de área foliar, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas e matéria seca, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência de mudas, controle de doenças e aumento de produtividade, acúmulo de nitrogênio, fósforo e etc. (MARIANO et al., 2004).

As BPCP podem ser encontradas tanto na superfície da planta (epifíticas) ou no tecido (endofíticas). As endofíticas são encontradas no interior das plantas e estão em vantagem neste habitat por não estarem sujeitas à competição por nutrientes que normalmente ocorre no solo da rizosfera. Além disso, tendem a ter maior eficiência uma vez que, ao contrário das colonizadoras de rizosfera, já estão internamente nos tecidos vegetais, onde os compostos bioativos por elas sintetizados encontram-se prontamente disponíveis às plantas (MARIANO et al., 2004; ROESCH et al., 2007).

Bactérias endofíticas são aquelas que podem ser isoladas de tecidos vegetais desinfestados ou extraídas do interior da planta e não causam prejuízo visível à mesma. A associação bactéria endofítica e planta consiste em uma interação íntima, na qual a planta fornece os nutrientes e habitat, enquanto a bactéria influencia no crescimento e sanidade da planta. Na maioria dos gêneros de bactérias endofíticas, a produção de auxinas, etileno e citocininas, fixação de nitrogênio, o aumento da absorção de água e nutrientes bem como a supressão de microrganismos deletérios são responsáveis pelo crescimento da planta (MARIANO et al., 2004).

Estudo realizado por Guimarães e colaboradores (2003) mostraram o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro, cultivado em condições de casa de vegetação e campo. Observaram que a inoculação contribuiu para o aumento da matéria seca, N-total e produção de grãos da cultivar Guarani, crescidas em condições de casa de vegetação. Entre as estirpes estudadas, a ZAE94 de *H. seropedicae* foi a que promoveu maior aumento (50%) na produção de grãos da variedade Guarani, crescida sob condições de campo, mostrando assim grande potencial.

2.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica do N₂ (FBN) é um processo importante, pois através deste é possível disponibilizar nitrogênio às plantas, sendo realizado exclusivamente por

procariotos. Esses microrganismos conseguem realizar a FBN devido à presença da enzima nitrogenase, capaz de promover a reação de quebra dos átomos de nitrogênio à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia de processos foto e quimiossintéticos, ou obtidas a partir de carboidratos (provenientes da fermentação ou respiração) e armazenada sob a forma de ATP (FIGUEIREDO et al., 2008).

Entre as décadas de 50/60 do século passado no Brasil, iniciaram-se os estudos de microrganismos fixadores de nitrogênio (diazotróficos) em gramíneas, quando foi estudada a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas de *Paspalum notatum* (DÖBEREINER, 1953). Estes estudos iniciais revelaram a existência de bactérias diazotróficas de vida livre em solos tropicais, resultando na descrição de novos gêneros e espécies, sendo *Azotobacter* e *Beijerinckia* os mais estudados na época.

Deste então a interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial evidenciado na melhoria da produção das culturas e, conseqüentemente, na redução dos custos de produção ao diminuir a quantidade de adubos nitrogenados minerais a serem aplicados e ao potencial biotecnológico, conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais (SILVA et al., 2004; GUIMARÃES et al., 1999).

Quanto aos aspectos ambientais, a FBN preenche os requisitos exigidos para uma agricultura sustentável, já que a utilização de fertilizantes nitrogenados minerais representa uma significativa parcela nos custos de produção da cultura, além de serem, na sua maioria, obtidos industrialmente de fontes não-renováveis, e potencialmente poluentes ambientais (SILVA et al., 2004).

Considerando a sustentabilidade da agricultura como sendo o manejo correto dos recursos que satisfaçam as mudanças necessárias ao homem, aliado à manutenção ou melhora da qualidade ambiental, nota-se que a FBN faz parte de um dos principais componentes dessa sustentabilidade: o processo não despende energia, não polui e enriquece o solo com nitrogênio, o qual será aproveitado pela cultura seguinte (LOMBARDI, 1999).

Experimentos recentes têm demonstrado que a inoculação de bactérias endofíticas com plantas da família *Poaceae* apresentam potencial significativo, respondendo com aumento na produção (GUIMARÃES et al., 1999). Por outro lado, a contribuição da FBN em *Poaceae* não é tão significativa como a das simbioses entre plantas da família leguminosas e bactérias coletivamente conhecidas como rizóbios. Entretanto, se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e

cereais, esta se torna importante, em termos globais (NÓBREGA et al., 2004). A cultura de arroz, por exemplo, que consome atualmente cerca de 10 milhões de toneladas de adubos nitrogenados para produzir 500 milhões de toneladas de grãos no planeta, se tiver uma substituição de 25% da demanda de N pela fixação biológica, geraria uma economia de aproximadamente 380 milhões de dólares/ano (BALDANI et al., 2002).

Rodrigues et al. (2006) avaliaram a ocorrência e a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas, associadas a duas variedades de arroz cultivados em dois tipos de solos, sob condição de inundação. Observaram que as populações de bactérias diazotróficas oscilam durante o desenvolvimento das variedades de arroz. Nos dois tipos de solo, o número de bactérias diazotróficas endofíticas, isoladas das duas variedades de arroz, o gênero *Burkholderia* se destacou.

As bactérias que habitam o interior do tecido vegetal podem contribuir de forma mais efetiva para a FBN, já que a troca se faz de forma direta, e há menos competição por fontes de carbono, pois nem todos os microrganismos são capazes de penetrar no tecido vegetal (BALDANI et al., 1997). Assim, bactérias diazotróficas exercem múltiplos mecanismos interagindo para obtenção dos benefícios propiciados às plantas às quais estas bactérias estão associadas. Deste modo, bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas podem ser classificadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas, já que são capazes de promover benefícios às plantas, não exclusivamente pela FBN (SALA; SILVEIRA; CARDOSO, 2007).

Em estudo realizado por Ferreira et al. (2003) peletização das sementes de arroz com turfa inoculada com bactérias diazotróficas foi capaz de promover aumentos na produção de grãos da variedade IR42 e IAC4440 em condições de campo. Os resultados de inoculação mostraram-se promissores para a utilização da prática de inoculação em nível de campo.

Outro estudo mostrou o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro, cultivado sob condições de casa de vegetação e campo, observaram que houve uma contribuição para o aumento da matéria seca, N-total e produção de grãos da cultivar Guarani, crescidas sob condições de casa de vegetação. Entre as estirpes estudadas, a ZAE94 de *H. seropedicae* foi a que promoveu maior aumento (50%) na produção de grãos da variedade Guarani, crescida sob condições de campo (GUIMARÃES et al., 2003)

Barraquio et al. (1997) realizaram um estudo com o objetivo de isolar bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes espécies de arroz. O número dos colonizadores

interno foi encontrado para ser significativamente maior que o número de bactérias da superfície, e a colonização de raiz, mas o tecido não subepidérmica *gusA* marcado pela bactéria *Herbaspirillum seropedicae* Z67 foi encontrado para ser virtualmente eliminado.

Estudos realizados com o objetivo de avaliar a diversidade e a estrutura da comunidade de bactérias diazotróficas endofíticas, bem como a expressão do gene *nifH* em cada parte da planta e o estágio de crescimento do arroz sob diferentes condições de solo foram investigadas. Mostraram que a utilização da fonte de carbono e produção de AIA, pectinase e celulase indicaram alta diversidade nos tecidos de arroz. A presença de bactérias diazotróficas foi detectada em raízes, caules e folhas. Os primers *nifH* demonstraram menor diversidade de bactérias diazotróficas em raízes de arroz cultivado em solos de várzea alterada, com fertilizante nitrogenado que na adubação do solo e anteriormente não cultivadas. A expressão do gene *nifH* poderia ser detectado de forma diferente em cada parte e estágio de crescimento de plantas de arroz, além de ser influenciado pelo nível de nitrogênio no solo. O nível de expressão do gene *nifH* em todas as raízes de plantas cultivadas em solo N-fertilizado foi a menor entre os tratamentos estudados. Os resultados confirmam a complexidade da comunidade de bactérias diazotróficas endofíticas, e indicam que o tipo de tecido vegetal parece influenciar a estrutura da comunidade (PRAKAMHANG et al., 2009).

Outro estudo verificou que a incubação de *Azotobacter* e *Azospirillum* aumentou substancialmente o nitrogênio total, nitrogênio não-orgânicos hidrolisáveis e nitrogênio orgânico hidrolisáveis. O nitrogênio mineral aumentou do perfilhamento máximo para as fases de floração da cultura, seguida por um declínio na maturidade, o nitrogênio orgânico hidrolisáveis diminuiu com um aumento a idade da cultura (DAS; SAHA, 2003).

O *O. glumaepatula* possui uma grande variabilidade genética, segundo Brondani e seus colaboradores (2005), as populações localizadas em regiões ameaçadas de devastação, é urgente que, em condições de conservação *in situ* devem ser criados ou que ser feita para coleções *ex situ* de preservação para evitar a perda de variabilidade genética da espécie. Dentre os grupos de bactérias diazotróficas encontradas no arroz selvagem o *Azoarcus* spp. demonstrou preferência sobre as cultivares modernas (ENGELHARD et al., 2000). A *Herbaspirillum* sp. B501 também é uma diazotrófica endófito compatível com arroz selvagem (ELBELTAGY et al., 2001).

Em trabalho realizado com arroz selvagem *Oryza rufipogon* Griff, foram isolados bactérias diazotróficas endofíticas, estas mostraram grande diversidade e algumas bactérias diazotróficas mostraram alta atividade da nitrogenase. Os testes de inoculação destes isolados em arroz, indicou que as isoladas de forma significativa promoveu o crescimento do arroz (TAN et al., 2009).

2.3. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO

Um dos fatores que afetam o crescimento vegetal é a disponibilidade de nutrientes, notadamente, no caso dos solos brasileiros, a de fósforo (P). Para suprir essa carência, são utilizados fosfatos solúveis em dosagens superiores às necessidades das culturas, pois a maior parte do P aplicado ao solo é adsorvido aos colóides do solo tornando-se indisponível (SILVA-FILHO; NARLOCH; SCHARF, 2002; SOUCHIE et al., 2005).

Muitos microrganismos participam no ciclo do fósforo transformando e disponibilizando-o para as plantas, através da decomposição da matéria orgânica ou pela solubilização de fosfato insolúvel. A capacidade solubilizadora é ubíqua no solo. Essas simbioses entre plantas e microrganismos são regras na natureza e facilitam a absorção de nutrientes, influenciando no crescimento e estruturação das comunidades vegetais. A existência de uma maior associação entre as bactérias solubilizadoras de fosfato e leguminosas pode propiciar uma melhor adaptação dessas plantas (BARROSO; OLIVEIRA, 2001).

Em muitos solos do mundo, bem como nas principais classes de solos da Amazônia, há deficiência de P na forma disponível para as plantas. A reduzida disponibilidade de fósforo nos solos tropicais decorre da reatividade das formas solúveis de P com cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) e alumínio (Al), formando compostos de baixa solubilidade. Nos solos ácidos, os fosfatos predominantes são os formados pela associação de P com Fe e/ou Al, enquanto nos solos com pH mais elevado predominam as formas associadas ao Ca (BARROSO; NAHAS, 2005).

No solo, o P está sujeito a diversos processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre estes processos, destaca-se a dissolução das formas pouco solúveis de P, tornando-as disponíveis para as plantas (RICHARDSON, 2001; SOUCHIE et al., 2007). Diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos,

possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos (SOUCHIE et al., 2005; 2006; BARROSO; NAHAS, 2008). O ácido orgânico identificado em estirpes com habilidade de solubilização de fosfato foi o ácido 2-cetogluconico, presente em *Rhizobium leguminosarum* e em *Rhizobium meliloti* (IGUAL et al., 2001). Muitos microrganismos solubilizadores de fosfatos têm sido estudados em função de sua habilidade em solubilizar complexos de P-Ca *in vitro*, e o complexo de P-Ca pode ser solubilizado pela redução no pH (GYANESHWAR et al., 2002).

Em solos com pH próximos à neutralidade ou ligeiramente alcalinos como alguns do semi-árido brasileiro, uma grande parte do P pode estar ligado ao cálcio formando compostos susceptíveis à solubilização por uma série de microrganismos rizosféricos que produzem acidez (SOUCHIE et al., 2007).

Fosfatases ácidas não específicas, produzidas por bactérias, são enzimas secretadas, produzidas como proteínas periplasmáticas solúveis ou como lipo-proteínas ligadas à membrana, que geralmente são capazes de desfosforilar uma ampla variedade de substratos estruturalmente independentes e exibem atividade catalítica ótima em valores de pH ácidos e neutros (ROSSOLINI et al., 1998).

Pesquisas têm sido realizadas envolvendo um grande número de microrganismos solubilizadores de fosfato, objetivando desenvolver alternativas para a melhoria do suprimento de P para as plantas. A capacidade e o potencial de solubilização variam conforme as fontes de nitrogênio, carbono, fósforo e o microrganismo. Alguns microrganismos podem solubilizar apenas fosfato de cálcio enquanto outros ainda solubilizam fosfato de ferro e de alumínio (SILVA-FILHO & VIDOR, 2001).

Atualmente, um crescente interesse tem surgido em relação à importância da diversidade microbiana edáfica já que os microrganismos desempenham papel fundamental na manutenção da qualidade do solo (GARBEVA et al., 2004). Dentre os microrganismos do solo, os solubilizadores de fosfatos inorgânicos desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), apresentando potencial de uso na forma de inoculante (SOUCHIE et al., 2005). Diversos autores (OMAR, 1998; KIM et al., 1997) relatam que a solubilização de fosfatos é correlacionada com a habilidade de produção de ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos.

Silva-Filho e Vidor (2000) observaram que diferenças na capacidade e no potencial de solubilização apresentada pelos isolados nas diferentes fontes de fósforo e de carbono mostram que alterações nas condições do meio ambiente ou meio de cultura podem modificar o mecanismo envolvido e, ou, a eficiência do processo de solubilização do fosfato. Assim o crescimento, a capacidade e o potencial de solubilização dos microrganismos variaram tanto entre quanto dentro das fontes de fosfatos.

Em estudo realizado em região Amazônica cujo objetivo deste trabalho foi avaliar e classificar *in vitro* a capacidade de isolados de rizóbio de solos da Amazônia na solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio e a eficiência simbiótica de isolados selecionados e inoculados em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Wallp). Observou-se que entre os rizóbios isolados de solos da Amazônia avaliados, 56% apresentaram capacidade para solubilização de fosfatos em meio de cultura, predominando baixos índices de solubilização. Dos isolados, oito proporcionaram maiores teores de P da parte aérea, resultando em melhor eficiência na utilização de P (EFU-P) e eficiência simbiótica pelas plantas (CHAGAS JUNIOR et al., 2010).

2.4. PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

Auxinas são reguladores de crescimento vegetal que interferem na alongação celular. Também controlam a atividade de genes através de uma seqüência de eventos. Inicialmente, as auxinas ativam proteínas receptoras presentes na membrana celular, esses receptores enviam mensageiros secundários que irão ocasionar dois tipos de efeitos na célula vegetal efeitos de rápida resposta e efeitos de longo prazo (MACHADO et al., 2006).

O ácido indol acético (AIA) é um fitormônio que pode ser sintetizado por microrganismo do solo e que também podem apresentar a capacidade de se associar as plantas. As alterações radiculares detectadas em plantas inoculadas com *Azospirillum* podem explicar a melhor absorção de minerais pela planta. Apesar da grande produção de AIA em culturas puras, não se conhece ainda como ocorre o processo no interior das plantas ou na região rizosférica (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Muitas estirpes de *Azospirillum* são encontradas no interior das raízes de *Poaceae* e o

crescimento verificado nestas pode ser devido à produção e excreção de auxinas (LODEWYCKX et al., 2002).

Experimentos de isolamento de bactérias endofíticas têm revelado grande variabilidade de isolados bacterianos capazes de produzir auxinas “*in vitro*” que, quando inoculados em plantas, promovem o aumento do crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle (ASGHAR et al., 2002; KHALIQ et al., 2004).

Foi relatado que os fitormônios, principalmente o ácido indol acético (AIA), excretados por *Azospirillum*, desempenham um papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral. Para as não-leguminosas, *Azospirillum* tem demonstrado ser benéfico para a fixação de nitrogênio e nutrição de plantas (BASHAN; HOLGUIN, 1997).

Teixeira et al. (2007) observaram microrganismos endofíticos em plantas de mandioca, com capacidade para fixar nitrogênio atmosférico e produzir AIA *in vitro*. Em estudo de comparação da capacidade de estabelecimento endofítico das bactérias diazotróficas, *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho e arroz, foi observado que as plantas de milho obtiveram melhor desempenho em comparação às plantas de arroz, relacionando o resultado a capacidade de fornecimento de metabólitos, já que os microrganismos diazotróficos dependem do fornecimento de metabólitos pelas plantas para expressarem sua capacidade de fixar biologicamente o N₂ atmosférico e/ou produzir hormônios de crescimento (PERIN et al., 2003). Como os experimentos foram conduzidos em substrato estéril e pobre nutricionalmente, a planta só dispôs das reservas da semente para seu desenvolvimento, logo pelo tamanho da semente de milho suas reservas contribuíram para o maior suprimento nutricional das plantas que a semente arroz, implicando num melhor desenvolvimento das plantas, que conseqüentemente suportam a população microbiana.

A produção de fitormônios ou análogos destes por microrganismos endófitas também pode promover o crescimento de plantas. A pesar dos estudos realizados, é importante o conhecimento de organismos produtores de ácido indol acético (AIA), necessitando de estudos adicionais aos já realizados (MACHADO et al., 2006).

2.5. A CULTURA DE ARROZ

O arroz é um dos cereais mais importantes, consumido por mais da metade da população como principal alimento. A maior produtividade do arroz inundado e o fato de que em algumas regiões do país as várzeas constituem a única alternativa para a expansão da fronteira agrícola, têm levado à incorporação o processo produtivo dos solos de várzea, incluindo os solos orgânicos (ASSIS; BERTONI; CARVALHO, 2001).

Em Roraima, a produção de arroz vem evoluindo ao longo dos anos, deste desenvolvimento destacam-se três fases distintas. A primeira fase ocorreu com o início da implantação das primeiras colônias agrícolas, em área de floresta, na década de 50 e a plantação era realizada por pequenos agricultores visando abastecer o pequeno mercado regional formado pela zona rural e urbana, em particular a cidade de Boa Vista. Novas colônias foram criadas em áreas de assentamento/colonização e o arroz apresentava-se como a principal cultura utilizada após o corte e a queima da floresta nativa, assim sua expansão atingia todas as regiões do Estado. Na segunda fase do sistema tradicional de cultivo de arroz nas áreas de assentamento de Roraima, surgira, a partir de 1977, novas perspectivas de produção de arroz em larga escala com a incorporação das áreas de savana por médio e grandes produtores, em sua maioria oriundos da região sul do país que chegaram a Roraima incentivados pelas facilidades oferecidas pelas linhas de crédito dos bancos oficiais. A cultura era plantada com mecanização agrícola em todas as etapas do processo produtivo, inclusive com o uso de fertilizantes químicos (BRAGA et al., 2009).

No ecossistema de várzeas, de uma maneira geral, os solos apropriados para o cultivo de arroz nas várzeas caracterizam-se por serem hidromórficos e apresentarem topografia plana, sendo, conseqüentemente sujeitos a inundações nos períodos de chuva. Por possuírem horizontes argilosos, que apresentam condutividade hidráulica baixa, são também de difícil drenagem. Essas condições favorecem o cultivo do arroz, não sendo, contudo, adequadas para utilização com outras culturas. Nesse ecossistema, a cultura do arroz pode ser encontrada sob cultivo em várzeas sistematizada, irrigada pela água de chuva ou pela elevação do lençol freático. Para condições de irrigação por submersão, deve-se evitar os solos arenosos por propiciarem maior consumo de água e lixiviação dos nutrientes. Em geral, os solos de várzeas do Estado de Roraima embora apresentem limitações nutricionais, com níveis baixos de fósforo, potássio, cálcio e magnésio,

elevada acidez e altos teores de H⁺ Al, quando corrigidos apresentam condições favoráveis ao cultivo do arroz irrigado (CORDEIRO et al., 2009)

A cultura do arroz é altamente dependente de fertilizantes, principalmente os nitrogenados, que aumentam a poluição do ambiente, contaminam os mananciais com nitrato, acidificam o solo e emitem gases como N₂O (GUIMARÃES et al., 2007). Uma das soluções para diminuir as aplicações de fertilizantes nitrogenados nos cultivos de arroz é a utilização da interação entre a planta e a bactéria diazotrófica, pois o maior potencial de fixação de nitrogênio do ar é atribuído às bactérias diazotróficas de caráter microaerófilico, como, por exemplo, as espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* (DÖBEREINER, 1992), *Burkholderia* (BALDANI, 1996) e *Azoarcus* (REINHOLD-HUREK et al., 1993), que colonizam partes internas das raízes e partes aéreas de gramíneas (BALDANI et al., 1997). Vem crescendo o interesse no estudo na cultura de arroz, a quantificação da fixação biológicas de nitrogênio, buscando-se substituir parcialmente o adubo nitrogenado industrializado (GUIMARÃES et al., 1999).

A tribo Oryza, que contém o gênero Oryza, é atualmente composta por 23 espécies, com destaque para duas espécies cultivadas: *O. glaberrima* Steud., arroz cultivado africano e *O. sativa* L., arroz cultivado asiático. O gênero Oryza tem suas origens e distribuição em várias partes do mundo, tais como no continente asiático, onde são encontrados *O. sativa*, *O. granulata*, *O. meyeriana*, *O. nivara*, *O. rufipogon*, *O. minuta*, *O. rhizomatis*, entre outros, no continente africano, com destaque para *O. glaberrima*, *O. barthii*, *O. longistaminata*, *O. punctata*, *O. brachyanta*, entre outros; no continente americano, onde se encontram *O. glumaepatula*, *O. lafifolia*, *O. alta*, *O. grandiglumis*; no continente australiano, com destaque para *O. australiensis* e *O. meridionalis* (VAUGHAN; CHANG, 1995). Muito pouco se conhece sobre as espécies silvestres de Oryza, principalmente aquelas nativas da América do Sul. Os poucos estudos realizados com espécies sul-americanas utilizam um número limitado de acessos, restritos geograficamente à região de Manaus, na Amazônia (MAGALHÃES JÚNIOR; OLIVEIRA, 2008).

2.6. ARROZ SILVESTRE *Oryza glumaepatula* (Steud)

O Brasil é um dos poucos países do mundo que ainda dispõe de populações extensivas de espécies silvestres de arroz em condições naturais, em especial na Amazônia e no Pantanal Matogrossense, isolados de cultivos comerciais e, portanto, sem a introgressão de alelos da espécie cultivada (RANGEL et al., 2006). *Oryza glumaepatula* é um parente diplóide selvagem do arroz cultivado, nativo da América Central e do Sul, e é, portanto, uma fonte potencial de alelos de importância agronômica para programas de melhoramento genético de arroz (BRONDANI et al., 2002). Silva e colaboradores (2007) avaliaram a diversidade genética e parâmetros de estrutura genética, utilizando marcadores microssatélites, em sete populações de *O. glumaepatula*. Verificaram que as populações se agruparam aproximadamente de acordo com as suas respectivas bacias hidrográficas.

Sendo uma espécie nativa, a *O. glumaepatula* é diplóide ($2n= 24$ cromossomos) e possui genoma AA, semelhante a da espécie cultivada *O. sativa*, demonstrado alto potencial de uso no melhoramento genético da cultura. A espécie *O. glumaepatula* apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas áreas de várzeas da Amazônia e também bioma cerrado (RANGEL et al., 2006). A *O. glumaepatula* é colhido em pequenas quantidades, para consumo esporádico por algumas comunidades, mas nunca plantado (MARTIN, 2005).

Com o objetivo de mapear as espécies de arroz silvestres, foram realizadas expedições sendo observadas *O. glumaepatula* no cerrado do Estado de Roraima onde estão ameaças de extinção, devido a alterações do ecossistema, tanto devido à expansão da fronteira agrícola quanto da pecuária extensiva (RANGEL et al., 2006).

O. glumaepatula tem ampla distribuição e é raramente encontrado em locais fora da água. Cresce às margens dos rios e lagos e sua presença está relacionada com a incidência direta de luz. Vulgarmente essa espécie é conhecida como arroz flutuante (RANGEL, 1998). Em resposta à elevação do nível da água dos rios, ocorre um rápido alongamento dos seus entrenós, fazendo que as plantas atinjam uma altura de até 7 metros. Ao se quebrarem, formam grandes populações flutuantes (MAGALHÃES JÚNIOR; OLIVEIRA, 2008).

Um estudo com esta espécie no Lago Batata no Pará avaliou o ciclo da planta. Foi verificado que sementes de *O. glumaepatula* germinam no final de outubro e no início de dezembro ocorre seca, diminuindo os níveis de água e expondo sedimentos. As

mudas passam por uma fase de crescimento curto até começarem a encher e tornam-se progressivamente inundados pela subida da água. O alongamento da haste ocorre rapidamente com o constante aumento do nível de água durante o período de final de dezembro para o final de maio. Este alongamento da planta continua até o final do período de inundação, que ocorre em junho (ENRICH-PRAST; ESTEVES; BIESBOER, 1999).

Segundo Rangel e colaboradores (2006), foram coletadas amostras de população de *O. glumaepatula* em Boa Vista, Bonfim, Alto Alegre, Caracaraí e Normandia, a maioria das amostras foi coletada em áreas de várzea dentro do bioma cerrado (lavrado). As áreas de várzea são totalmente isoladas das bacias dos grandes rios e caracterizam-se por apresentarem uma vegetação herbácea com uma forte presença de buritis. No Parque Nacional do Viruá, município de Caracaraí, essas populações foram encontradas em áreas de campinarana, áreas de baixa fertilidade e solo bastante arenoso.

3. ARTIGO: OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM ARROZ SILVESTRE (*Oryza glumaepatula*) EM ÁREAS AMAZÔNICAS

3.1. RESUMO

Espécies de arroz silvestre são colonizadas por bactérias diazotróficas, contudo, pouco se conhece sobre a colonização em *Oryza glumaepatula* Steud. Este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias diazotróficas de arroz silvestre em áreas de mata e cerrado no bioma amazônico. Amostras de plantas selvagens foram coletadas e utilizadas para o isolamento bacteriano, sendo as bactérias obtidas avaliadas quanto à formação de película em meio de cultura semi-sólido. Posteriormente, as que apresentaram a formação de película foram analisadas quanto a presença do gene *nifH* utilizando os iniciadores PolF/PolR e, as que foram positivas, caracterizadas através de Box-PCR, solubilização de fosfato de Ca e produção de ácido indol acético (AIA). Trinta e oito bactérias, cerca de 4% do total, formaram película e apresentaram produto de amplificação do gene *nifH*. A incidência de bactérias diazotróficas foi semelhante entre as áreas, porém maior número foi isolado na parte aérea das plantas. Além disso, mais de 30% das bactérias diazotróficas apresentaram produção de AIA e/ou solubilização de fosfato, sendo a maior concentração na parte aérea das plantas do cerrado. Nessa área ocorre maior diversidade genotípica de bactérias diazotrófica associadas ao arroz silvestre e maior número destas bactérias capazes de solubilizar fosfatos e produzir AIA.

Palavras-Chave: arroz silvestre, FBN, Amazônia, recurso genético, ácido indol acético e solubilização de fosfato.

3.2. ABSTRACT

Species of wild rice are colonized by diazotrophic bacteria, however, little is known about the colonization in *Oryza glumaepatula* Steud. This study aimed isolate and characterize diazotrophic bacteria of the wild rice from forest and cerrado areas in the Amazon biome. Samples of wild plants were collected for bacterial isolation, and semi-solid medium was used to assay the pellicles formation by the bacteria. Later, the *nifH* gene was also amplified by PCR using the primer set PolF/PolR and the bacteria, each one was positive, characterized through Box-PCR, solubilization of calcium phosphate and production of indol acetic acid (AIA). Thirty eight bacteria, around 4% of the total, formed pellicles and also presented *nifH* gene amplification. The incidence of diazotrophic bacteria was similar among the areas, however, higher number was isolated from the aerial part of the plants. Besides that, more than 30% of the diazotrophic bacteria produced AIA and/or solubilized phosphate, and the largest concentration of these bacteria was isolate in the aerial part of the plants from cerrado. In this area happens higher genotypic diversity of diazotrophic bacteria associated to the wild rice and also the larger number of these bacteria are capable producing AIA and solubilizing phosphate.

Key-words: Wild rice, BNF, Amazon, genetic resource, indol acetic acid, phosphate solubilization.

3.3. INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste numa importante fonte de nitrogênio (N) para os ecossistemas naturais e agrossistemas. Entre os vegetais, além das leguminosas, a família *Poaceae* também tem a capacidade de se associar com bactérias diazotróficas e contribuir com uma parcela importante do N aportado aos sistemas agrícolas, especialmente devido à grande extensão de área cultivada (JAMES, 2000; BALDANI et al., 2009). E, devido à importância de alguns cereais como o arroz, milho, e trigo, muitos esforços da pesquisa tem sido despendidos para estudar a ecologia de bactérias fixadoras de N, selecionar àquelas eficientes no processo de FBN, ou mesmo no sentido de elucidar a forma de colonização e a resposta dos vegetais à presença do microrganismo (BALDANI et al., 2009).

O arroz, que representa um dos alimentos mais importantes mundialmente, é amplamente colonizado por bactérias diazotróficas associativas (TAN et al., 2003; BENEDUZI et al., 2008). Para essa cultura, contribuições significativas de diversas bactérias, especialmente dos gêneros *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* têm sido mostradas para o acúmulo de N e produtividade de grãos (DAS et al., 2003; RODRIGUES et al., 2006). Além disso, também tem sido verificado que entre as espécies do gênero *Oryza* ocorrem importantes diferenças no perfil da comunidade bacteriana diazotrófica e que fatores edafoclimáticos, ambientais, adubação, etc. influenciam esta associação (BIN et al., 2007). Isto indica que o gênero *Oryza* pode associar-se com ampla diversidade de bactérias, sendo um potencial alvo para estudos de ecologia e taxonomia de diazotróficos, merecendo destaque àquelas silvestres por abrigarem espécies bacterianas distintas das cultivares melhoradas (ENGELHAND et al., 2000; ELBERTAGY et al., 2001; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2005; ZHANG et al 2008, PENG et al., 2008; TAN et al., 2009). Estudos caracterizando bactérias associadas a espécies de arroz na China, têm resultado na descrição de novos gêneros e espécies como *Rhizobium oryzae* colonizando *O. alba* (PENG et al., 2008) e *Phylobacter* colonizando *O. rufopogon* (ZHANG et al., 2008).

O Brasil é um dos poucos países que ainda dispõe de populações extensivas de espécies silvestres de arroz isolados de cultivos comerciais em condições naturais, em especial na Amazônia e no Pantanal Matogrossense (RANGEL et al., 2006; MAGALHÃES JÚNIOR; OLIVEIRA, 2008). Isto indica que os recursos genéticos

microbianos associados a estas espécies ainda podem ser explorados e novas espécies e gêneros descritos, colaborando para o maior entendimento da taxonomia e ecologia desses microrganismos. A espécie *Oryza glumaepatula* Steud, objeto desse estudo, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas áreas de várzeas da Amazônia e também no cerrado (RANGEL et al., 2006; MAGALHÃES JÚNIOR; OLIVEIRA, 2008). Assim como outras espécies amazônicas, *O. glumaepatula*, representa um recurso genético potencial (BRONDANI et al., 2002) e a ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a esta espécie ainda é desconhecida. Contudo, pelo fato de desenvolver-se adequadamente e com expressiva produção de biomassa em solos pobres em nitrogênio, há indicativo da presença de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas, despertando o interesse no isolamento destes microrganismos que poderão ser inoculados e avaliados em outras espécies como o arroz comercial e o milho. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias diazotróficas de arroz silvestre de área de mata e cerrado no Estado de Roraima.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Em área de mata (Apêndice A) foram realizadas duas coletas de plantas de arroz silvestre, sendo três pontos amostrados em abril de 2008 e outros dois pontos em abril de 2009 e, no cerrado (Apêndice B), foi realizada uma coleta em sete locais em setembro de 2008 (Tabela 3.1). Com as amostras da primeira coleta em 2008, realizou-se um estudo preliminar comparando-se o isolamento bacteriano a partir de plantas cultivadas em solo, coletado em campo, e abrigadas em casa de vegetação, com o isolamento direto de plantas selvagens, sendo observada maior diversidade de bactérias e quantidade de diazotróficas nas plantas selvagens. Desta forma, para as etapas posteriores, utilizou-se o isolamento diretamente de plantas selvagens, considerando esta estratégia mais apropriada para a avaliação de maior diversidade.

Os pontos amostrados na mata compõem uma região permanentemente alagada ou ao menos de solo encharcado, e conseqüentemente o arroz apresenta constante rebrota ou até mesmo hábito perene (ROSA et al., 2006). No cerrado, por outro lado, as plantas apresentam, predominantemente hábito anual com propagação por sementes e se

desenvolvem a medida que aumenta o nível das águas na estação chuvosa, desaparecendo na estiagem (RANGEL et al., 2006). Em todos os pontos coletou-se três amostras simples de solo e pelo menos três touceiras de arroz, estando essas em fase reprodução, para comporem uma única amostra representativa. No momento da coleta, removeu-se a parte aérea das plantas a 30 cm do solo as touceiras com solo aderido foram acomodadas em sacos plásticos para o transporte. Posteriormente, foram mantidas em vasos plásticos com o solo coletado no respectivo ponto e abrigadas em casa de vegetação por um período de 30-40 dias quando receberam 200 mL de solução de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950), mais duas aplicações de 20 mM de sulfato de amônio no intervalo de duas semanas (07 e 21 dias).

Após 30-40 dias, a parte aérea e as raízes das plantas de arroz foram separadas, lavadas com água de torneira e em seguida com água destilada esterilizada. Dez gramas de cada amostra, com 2 repetições, foram trituradas em liquidificador com 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) (Anexo B), permanecendo em repouso por 01 h. Realizou-se uma diluição até 10^{-6} , e alíquotas de 100 μ L da suspensão nessa diluição foram distribuídas em placas de Petri com o meio de cultura Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986) (Anexo A), com duas repetições, seguindo de incubação por 10 dias no escuro a 28°C. Após esse período, contou-se o número de colônias por placa e cada colônia com aspecto fenotípico diferente foi considerada um isolado bacteriano, sendo repicada para uma nova placa de Petri com o mesmo meio, seguindo-se de nova incubação. O crescimento bacteriano foi acompanhado por 10 dias, quando se procedeu a caracterização fenotípica das bactérias (NEDER, 1992). A partir da caracterização fenotípica foram realizadas análises de similaridade com o coeficiente *Simple Matching* e agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method). Também calculou-se o índice de diversidade de Shannon-Weaver considerando-se os grupos fenotípicos originados na análise de similaridade e contraste de valores pelo teste t (HUTCHESON, 1970).

Todos os isolados foram testados quanto à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico através da formação de película em meio de cultura semi-sólido (DÖBEREINER et al., 1995). Esta avaliação foi realizada inicialmente em microtubos com 0,5 mL do meio de semi-sólido BMGM (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) (Anexo C), incubando-se a 28°C por 10 dias no escuro e, posteriormente, as que apresentaram formação de película avaliadas também em frascos de vidro com 5 ml de meio.

Os isolados que formaram película em meio de cultura tiveram o DNA genômico extraído e purificado com o kit invisarb fragment cleanup (Invitekt), seguindo as recomendações do fabricante. Os iniciadores utilizados para a amplificação por PCR dos genes *nifH* foram PolF-5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3 e PolR-5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3', seguindo as informações descritas por Poly et al. (2001) com pequenas adaptações. A reação foi realizada em 12,5 µL contendo 9 µL de água ultra-pura; 1,25 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4) (Anexo F); 0,25 µL de dNTPs (7,5 mmol L⁻¹ de cada base); 0,5 µL de MgCl₂, (50 mmol L⁻¹); 0,4 µL de cada iniciador (50 pmol µL⁻¹); 0,5 µL de DNA molde (aproximadamente 50 ng); 0,2 µL de Taq (5 U µL⁻¹). O produto de amplificação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 1,2% e coloração com brometo de etídeo a 0,05%.

Para a reação de Box PCR com isolados que apresentaram a presença do gene *nifH*, utilizou-se o iniciador BOX A1 (5'-TACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994), com as condições de reação descritas por Hungria et al. (2008). A eletroforese foi realizada em gel de agarose (Bioamerica cat. n° DE1500-LE) a 1,9% com tempo de corrida de 6,5h, coloração em solução de brometo de etídeo a 0,05% e visualização em sistema de foto-documentação. Os perfis eletroforéticos foram analisadas pelo programa GelCompare (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica) e, para o agrupamento, foi o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo UPGMA.

Para a avaliação da produção de AIA (Anexo E), as bactérias foram cultivadas em 05 mL de meio de cultura Dyg's líquido adicionado de 100 µg mL⁻¹ de tripofano e incubação por 48 horas a 28°C, sob agitação a 150 rpm (SARWAR; KREMER, 1995). Como controle positivo utilizou-se a estirpe BR 11001 (=ATCC29729) de *Azospirillum brasilense*. Após a incubação, centrifugou-se 01 mL da suspensão bacteriana por 05 minutos a 520 g, e aplicou-se 150 µL do sobrenadante no poço de uma placa de poliestireno com capacidade para 300 µL, com 3 repetições. Adicionou-se, então, 100 µL do reagente de Salkowisk (01 mL de FeCl₃.6H₂O 0,5 M em 50 mL de HClO₄ a 35%), seguindo incubação por 30 minutos no escuro. A presença do hormônio foi avaliada pela absorvância em espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

Para avaliação da solubilização de fosfato de Ca (Anexo D) pelos isolados que apresentaram produto de amplificação dos genes *nifH*, as bactérias foram inoculadas em 03 pontos distintos sobre o meio de cultura GL sólido, acrescido de 50 mL de K₂HPO₄

(10%) e 100 mL de CaCl_2 (10%) após a autoclavagem, visando a formação do precipitado insolúvel de CaHPO_4 (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982; SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Após o período de incubação de até 15 dias a 28°C no escuro, mediu-se o tamanho do halo transparente formado no meio de cultura.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o isolamento de uma maior diversidade de bactérias diazotróficas associadas a *O. glumaepatula* realizou-se a inoculação inicial do extrato vegetal em meio de cultura sólido Dyg's rico em nutrientes e fontes de carbono e posterior avaliação da formação de película em meio de cultura semi-sólido BMGM. Optou-se por esta estratégia, pois o isolamento direto em meios de cultivos semi-sólido tradicionais, apesar de serem apropriados para avaliar a colonização de plantas de *Oryza* spp. por gêneros diazotróficos bem caracterizados, como *Azospirillum* (BALDANI; DÖBEREINER, 1980), *Herbaspirillum* (ELBELTAGY et al., 2001), *Burkholderia* (GUIMARÃES et al., 2007) e *Sphingomonas* (VIDEIRA et al., 2009), podem apresentarem seletividade para outros grupos de bactérias ainda não caracterizados com relação às exigências nutricionais ou ainda não conhecidos (TAN et al.; 2009). Esta estratégia utilizando meio de cultura sólido e posteriormente semi-sólido já foi aplicada com sucesso, evidenciando alta diversidade (Apêndice D) de bactérias diazotróficas em arroz (STOLTZFUS et al., 1997).

Com a contagem das colônias crescidas a partir do espalhamento das diferentes diluições do macerado de plantas no meio de cultura Dyg's, foi observada uma densidade bacteriana que variou de 1,0 a $38,0 \times 10^6$ e de 0,53 a $9,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias (UFC) g^{-1} de tecido vegetal para a área de mata e cerrado, respectivamente (Tabela 3.1). Nas amostras oriundas da área de mata e de cerrado foram observadas, respectivamente, 442 e 1214 colônias fenotipicamente diferentes. Após a repicagem, apenas 226 isolados da mata apresentaram crescimento e 737 do cerrado (Tabelas 3.1 e 3.2).

Tabela 3.1. - Localização das áreas, análise do solo, unidades formadoras de colônia, número de isolados bacterianos totais e número de isolados diazotróficos obtidos a partir de plantas de arroz selvagem coletadas em área de mata e cerrado no Estado de Roraima.

ÁREA	Coordenadas	pH	Al	K	Ca	Mg	M.O.	P	Textura do solo			Parte da planta ⁽¹⁾	UFC ⁽²⁾ (x10 ⁶)	Isolados obtidos	Isolados <i>nif</i> H ⁺ ⁽³⁾
		H ₂ O	cmol _c dm ⁻³			g dm ⁻³	mg dm ⁻³	Argila	Silte	Areia	g kg ⁻¹				
Área de Mata															
1	N 01°25'44,2" O 60°59'0,3"	5,4	0,22	0,03	1,08	0,01	13,9	1,08	5	19	76	A R	10 38	41 10	2 ND
2	N 1°25'10,2" O 60°59'9,2"	5,4	0,37	0,04	1,10	0,02	23,3	6,74	6	11	83	A R	8 15	22 15	3 1
3	N 01°24'01,1" O 60°59'01,7"	5,4	0,37	0,01	1,50	0,02	15,2	3,16	3	13	84	A R	17 18	10 21	1 2
4	N 1°24'02,4" O 60°59'09,2"	5,4	0,28	0,03	1,09	0,01	14,9	4,08	6	18	76	A R	1,5 4,3	19 31	ND ND
5	N 01°24'56,7" O 60°59'13,8"	?	0,31	0,03	1,07	0,01	14,9	2,08	5	17	78	A R	1 2	26 30	ND 1
Área de Cerrado															
1	N 02°59'06,8" O 60°21'07,4"	5,2	0,38	0,03	1,40	0,33	6,3	2,10	3	8	89	A R	1,16 3,96	69 57	5 ND
2	N 02°59'17,5" O 60°23'26,9"	5,5	0,13	0,01	1,37	0,34	1,0	2,08	2	1	97	A R	2,08 8,21	69 74	2 1
3	N 02°58'51,0" O 60°23'20,8"	5,1	0,33	0,02	1,55	0,42	1,3	3,54	14	8	78	A R	2,05 4,45	68 49	2 1
4	N 02°57'58,7" O 60°21'39,9"	4,5	0,33	0,03	1,38	0,35	6,1	2,92	3	2	95	A R	0,82 6,92	58 66	4 3
5	N 02°57'39,1" O 60°21'20,8"	5,7	0,13	0,01	1,29	0,34	1,0	1,48	2	1	97	A R	1,32 0,53	40 40	3 4
6	N 02°55'43,1" O 60°24'02,0"	5,5	0,23	0,06	2,44	0,70	8,6	0,64	6	17	77	A R	1,4 6,75	45 31	1 1
7	N 03°02'03,0" O 60°19'12,9"	5,3	0,13	0,04	1,37	0,42	2,2	1,66	9	4	87	A R	4,27 9,5	38 33	1 ND

(1) A – aérea e R – raiz; (2) Unidade formadora de colônias; (3) Isolados aplicados com iniciador para os genes *nif*H⁺; (4) Amostras de solo coletada no campo e cultivada com sementes de arroz silvestre em casa de vegetação; ND – não detectados pelo método.

Tabela 3.2: Número de isolados bacterianos totais e diazotróficos e incidência de bactérias diazotróficas em plantas de arroz silvestre coletadas em área de mata e cerrado no Estado de Roraima.

Área	Parte da planta	Nº de isolados obtidos	Nº de diazotróficos	Incidência de diazotróficos em relação ao total de bactérias (%) ¹
Mata	raiz	108	4	3,70 (40)
	aérea	118	6	5,08 (60)
	total	226	10	4,42
Cerrado	raiz	350	9	2,57 (33)
	aérea	387	19	4,65 (67)
	total	737	28	3,80
Total		963	38	3,95

¹Os números entre parênteses indicam a percentagem de diazotróficos em relação ao total de diazotróficos.

O fato de 40 a 50% dos isolados inicialmente obtidos não terem crescido após a primeira repicagem indica a dependência das bactérias isoladas a compostos possivelmente fornecidos através da suspensão do macerado vegetal. Além disso, também indica a presença de um grande percentual de bactérias fastidiosas, cujas necessidades nutricionais são desconhecidas (STOLTZFUS et al., 1997; ELBERTAGY et al., 2001).

Os valores do índice de Shannon-Weaver considerando os grupos fenotípicos de bactérias totais obtidos pela caracterização dos isolados bacterianos foram: 2,18 e 2,12 para a área de mata e cerrado, respectivamente, sendo significativamente iguais ($t=0,05$). Na mata, o valor do índice foi de 2,2 nas raízes e 2,04 na parte aérea das plantas, e no cerrado variou de 2,12 nas raízes e 2,08 na parte aérea, também não havendo diferença entre os valores em cada área. Isto mostra que a amostragem realizada foi adequada e representativa, pois embora tenha sido amostrado maior número de pontos no cerrado e, conseqüentemente maior quantidade de bactérias obtida, a diversidade observada foi semelhante.

Dos 962 isolados bacterianos obtidos a partir das plantas de arroz silvestre, 51 foram capazes de formar películas em meio de cultura semi-sólido, indicando serem fixadores de N em condições microaerofílicas (DÖBEREINER et al., 1995). Para estes isolados realizou-se a amplificação do gene *nifH* com os iniciadores PolF e PolR (POLY et al., 2001) e, diferentemente do reportado pelos autores, foram observadas ampliações inespecíficas com fragmentos de tamanhos diferentes que o esperado (cerca de 360pb) mesmo para a estirpe BR 11001 de *A. brasilense*, utilizada como

controle positivo, e temperatura de anelamento de 55°C, proposta originalmente. Tais bandas inespecíficas foram parcialmente eliminadas com o uso de temperatura de anelamento de até 62°C, isto porque ainda houve inespecificidade para alguns isolados mesmo nessa temperatura (Figura 3.1), enquanto para a maioria não houve nenhuma amplificação. Para as etapas posteriores foram considerados como diazotróficos apenas os 38 isolados para os quais observou-se a formação de película e também amplificação do gene *nifH* em ao menos uma das temperaturas de anelamento testadas.



Figura 3.1: Amplificação do gene *nifH* com iniciadores PolR e PolF da estirpe BR 11001 (linhas 2, 3 e 4 com as temperaturas de anelamento de 55, 59 e 62°, respectivamente), ERR 1020 (linhas 5, 6 e 7 com as temperaturas de anelamento de 55, 59 e 62°, respectivamente) e ERR 1027 (linhas 8, 9 e 10 com as temperaturas de anelamento de 55, 59 e 62°, respectivamente). Linha 1 e 12 marcador de peso molecular e 11 controle negativo.

Dentre as bactérias diazotróficas, 10 foram isoladas da mata e 28 do cerrado, sendo 25 oriundas da parte aérea das plantas e 13 das raízes (Tabela 3.2). Isto mostra que cerca de 4% das bactérias isoladas são fixadoras de N, havendo, entretanto, grande variabilidade no número destas bactérias a partir de cada ponto amostrado, independentemente da área (Tabela 3.1 e 3.2). Além disso, embora o número de bactérias diazotróficas tenha sido maior no cerrado, a incidência em relação ao total foi muito próxima ao observado na mata (Tabela 3.2). Outros estudos com espécies selvagens ou pouco melhoradas dentro do gênero *Oryza*, mostraram a incidência de bactérias diazotróficas associativas variou entre 01 a 30% do total de bactérias isoladas em meio de cultivo (BARRAQUIO et al., 1997; STOLTZFUS et al., 1997).

No presente estudo, também foi observada grande incidência de bactérias diazotróficas na parte aérea das plantas, chegando a ser quase 100% maior, comparativamente com as raízes, em ambas as áreas e, isso ocorreu em metade dos pontos amostrados (Tabela 3.2). Considerando apenas as diazotróficas, aquelas isoladas de raízes representaram entre 30-40% em relação ao total de diazotróficas e entre as

isoladas da parte aérea ao menos 60%, mostrando que para *O. glumaepatula*, maior incidência de bactérias diazotróficas parece ocorrer na parte aérea das plantas.

Frequentemente, maior número de bactérias diazotróficas é encontrado associado às raízes de *Poaceas* (BARRAQUIO et al., 1997; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2005; BRASIL et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; PRAKAMHANG et al., 2009), que representam o ponto inicial de infecção das plantas pelas bactérias (MATTOS et al., 2008). Contudo, maior população de diazotróficos na parte aérea das plantas, apesar de parecer exceção, também tem sido observada, tanto com espécies de *Oryza* quanto para outras *Poaceas* e, está associada à interação de diversos fatores ambientais como tipo de solo e inundação, entre outros (BRASIL et al., 2005; KOOMNOK et al., 2007; PRAKAMHANG et al., 2009). De acordo com Koomnok et al. (2007) é possível que o colmo represente um ambiente menos competitivo para as bactérias diazotróficas, podendo estas se beneficiar dos fotossintatos primeiramente em comparação com microrganismos da raiz. Por outro lado, devido à menor tensão de O₂ nas raízes, especialmente em condições alagadas, esperar-se-ia maior fixação de N nessa parte da planta, o que pode indicar não haver relação direta entre o número de bactérias isoladas e o funcionamento do processo de FBN. Isto demonstra a necessidade de quantificação da atividade ou avaliação da expressão da enzima nitrogenase nas plantas de arroz em condições naturais, de forma a entender se há maior atividade da FBN na parte aérea das plantas arroz silvestre, ou meramente as bactérias colonizadoras possuem maior habilidade de colonização deste sítio vegetal.

A caracterização molecular, baseada no Box-PCR, mostrou que todos os isolados estudados apresentaram perfis de amplificação únicos, pois nenhum dos isolados apresentou similaridade de 100% com outro, sendo inclusive diferentes das estirpes utilizadas como referência (Figura 3.2). Considerando a similaridade de 55%, constatou-se 12 grupos genotípicos, 04 deles (grupos IV, VI, IX e XII) apenas com um isolado, além de *Herbaspirillum frisingense*, o qual também ficou separado (Figura 3.2). No grupo I, cinco isolados agruparam com *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *H. seropedicae*, apresentando similaridade que variou de 65 a 85%. Por outro lado, no grupo VII, outros cinco isolados se agruparam com *H. rubrisubalbicans* com similaridade variando de 60 a 70% e, no grupo X, cinco isolados apresentaram entre 58 e 65% de similaridade com as estirpes referências de *Burkholderia*. Os demais isolados se distribuíram em 06 grupos distintos (II, III, V, VIII e XI) e sem a presença de estirpes referências. Tais

grupos apresentaram respectivamente 4, 5, 2, 4 e 4 bactérias, havendo similaridade acima de 60% dentro de um mesmo grupo (Figura 3.2).

O agrupamento dos isolados bacterianos obtidos por Box-PCR mostrou-se complexo (Tabela 3.3), ocorrendo de acordo com a área e/ou parte da planta onde as bactérias foram isoladas - exemplo grupo II apenas com bactérias da parte aérea de ambas as áreas e o grupo III e XI apenas com bactérias do cerrado e também outros reunindo bactérias de ambas as áreas e partes da planta –exemplo grupo I e VII- e, ainda os quatro grupos com apenas 01 isolado que foram oriundos do cerrado (Tabela 3.3). Isto mostra que ambas as áreas compartilham bactérias geneticamente semelhantes, porém no cerrado ocorreram bactérias exclusivas, uma vez que 14 delas –mais de 30% do total de diazotróficos- (grupos III, IV, VI IX, XI e XII), originaram-se de grupos exclusivos dessa área (Figura 3.1 e 3.2).

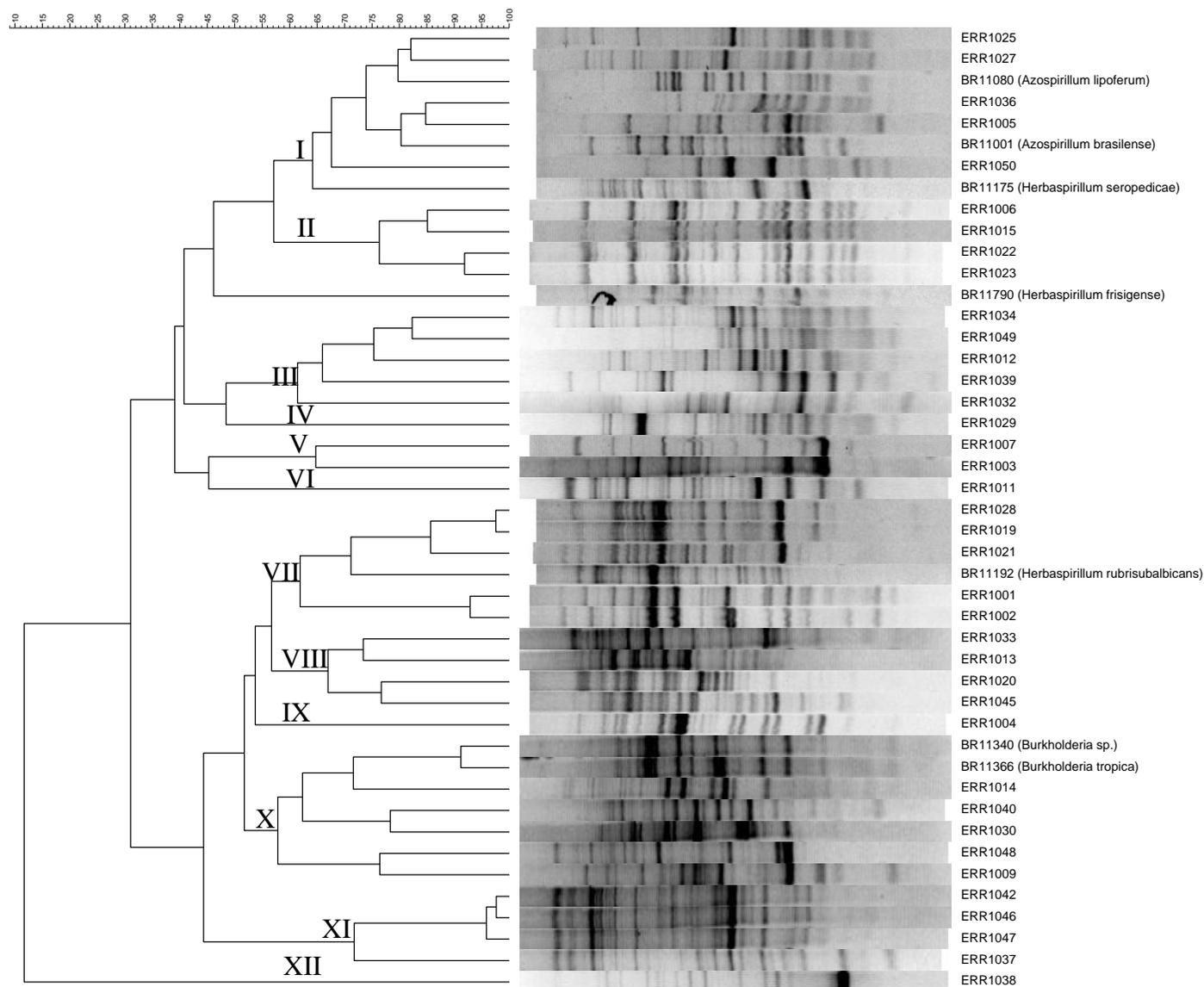


Figura 3.2: Dendrograma de bactérias diazotróficas oriundas de arroz silvestre elaborado a partir da amplificação por PCR com iniciadores para elementos Box. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Pearson.

Espécies de *Oryza* são abundantemente colonizadas por bactérias dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Azoacus*, entre vários outros (HUREK; REINHOLD-HUREK, 2005; ELBELTAGY et al., 2001; BALDANI et al., 2009) e, constantemente, novas espécies (CHENG-HUI et al., 2005; PENG et al., 2008) e gêneros são descritos (ZHANG et al., 2008). Além disso, em estudos recentes tem sido mostrado que espécies silvestres de arroz possuem associadas maior diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, comparativamente a *O. sativa*, sendo um possível reservatório de bactérias de interesse biotecnológico (HUREK; REINHOLD-HUREK, 2005). Neste estudo com *O. glumaepatula*, o agrupamento genotípico das bactérias revelou alta diversidade entre os 38 isolados diazotróficos obtidos, havendo pelo menos 05 grupos consistentemente distanciados das 07 espécies utilizadas como referência e, com pelo menos, quatro isolados apresentando perfis semelhantes dentro de cada um desses grupos (Figura 3.2). Também é importante destacar que os 4 grupos que apresentaram apenas 01 isolado também revelaram a presença de grupos bacterianos raros, especialmente o isolado ERR1038 com menos de 15% de similaridade com as demais bactérias (Figura 3.2). Desta forma, há uma indicação da presença de espécies bacterianas geneticamente distantes das utilizadas como referência, necessitando outros estudos, haja vista que a análise do Box-PCR mostrou maior similaridade entre as espécies de *Azospirillum* com *H. seropedicae* e *H. frigisigense*, do que essas duas últimas com *Burkholderia* e *H. rubrisubalbicans*, quando o esperado seria maior similaridade entre *Burkholderia* e *Herbaspirillum* que pertencem à classe das beta-proteobactérias e não com *Azospirillum* (BALDANI et al., 2009).

Para os 38 isolados diazotróficos também se avaliou a produção de AIA *in vitro* e a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio de cultura, considerando essas características como mecanismos importantes para a promoção do crescimento vegetal (SILVESTER-BRADLEY et al., 1982; ZAID et al., 2009). Observou-se, que oito isolados apresentaram halo de solubilização variando de 4 a 14 mm (Apêndice E) em meio de cultura com fosfato de cálcio insolúvel e que seis isolados foram capazes de produzir AIA, além disso, três destes isolados apresentaram ambos mecanismos (Tabela 3.3). Observou-se ainda, não haver relação aparente entre grupo genotípico e produção de AIA ou solubilização de fosfato (Tabela 3.4), indicando que esses mecanismos estão presentes em determinadas bactérias independentemente do perfil dos elementos Box. Isto corrobora informações postuladas que muitas bactérias diazotróficas são ubíquas desempenhando além da FBN, a solubilização de fosfatos

insolúveis e produção de AIA, que são mecanismos amplamente distribuídos entre microrganismos rizosféricos (KHAN et al., 2009; ZAID et al., 2009). Outras importantes observações foram cerca de 40% (11 de 28) dos isolados que apresentaram os mecanismos adicionais de promoção de crescimento vegetal originaram-se das plantas do cerrado, enquanto apenas 10% (01 de 10 isolados) da mata e, 09 das 11 bactérias do cerrado foram oriundas da parte aérea (Tabela 3.4). Estes resultados mostraram que há não só uma maior diversidade genotípica das bactérias diazotróficas no cerrado, como mostrado anteriormente, mas também maior diversidade metabólica entre essas bactérias, o que evidencia que nesta área devem existir microrganismos potenciais para a promoção do crescimento vegetal.

Tabela 3.3: Produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) por isolados bacterianos diazotróficos oriundos de plantas de arroz silvestre coletadas em área de mata e cerrado em Roraima.

Isolado	Grupo Genotípico	Área	Parte da planta	Produção AIA	Solubilização de P-Ca (formação de halo - mm)
ERR1019	VI	Mata	Raiz	+	15
ERR1036	I		Aérea	-	4
ERR1025	I		Aérea	-	5
ERR1006	II		Aérea	+	14
ERR1034	III		Aérea	-	4
ERR1039	III		Aérea	-	5
ERR1029	III	Cerrado	Aérea	+	-
ERR1048	IX		Raiz	-	5
ERR1030	IX		Aérea	+	6
ERR1028	VI		Aérea	+	-
ERR1042	X		Raiz	+	-
ERR1038	XI		Aérea	-	7

Tabela 3.4: Percentagem de isolados diazotróficos obtidos de arroz silvestre ocorridos em cada grupo genotípico, o qual se baseou na análise de Box-PCR (Figura 1.1). Os números entre parêntese indicam o número de isolados bacterianos.

Grupos genotípicos	Isolados diazotróficos (%)			
	Cerrado		Mata	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
I	20(1)	60(3)	20(1)	-
II	-	75(3)	-	25(1)
III	20(1)	80(4)	-	-
IV	-	100(1)	-	-
V	50(1)	-	50(1)	-
VI	100(1)	-	-	-
VII	20(1)	20(1)	-	60(3)
VIII	-	50(2)	-	50(2)
IX	-	100(1)	-	0
X	40(2)	40(2)	-	20(1)
XI	75(3)	25(1)	-	-
XII	-	100(1)	-	-

Os principais fatores edafoclimáticos que diferenciam as áreas estudadas são o maior teor de matéria orgânica no solo da mata e o fato dessa área permanecer alagada durante a maior parte do ano (Tabela 3.1), o que torna as plantas de arroz praticamente perenes. Dessa forma, embora as plantas coletadas estivessem em estágios vegetativos semelhantes em ambas as áreas, provavelmente na mata foram avaliadas touceiras mais velhas com rebrotas de ciclos anteriores e com maiores reservas nutricionais, enquanto no cerrado as plantas eram mais jovens e dependentes da associação microbiana para a disponibilização de nutrientes e outros compostos. Estas diferenças parecem ser determinantes para a colonização das plantas pelas bactérias diazotróficas, uma vez que sabidamente a população desses microrganismos responde drasticamente a cultivar vegetal, estágio de desenvolvimento e estado nutricional das plantas, além de outros fatores (TAN et al., 2003; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2005).

4. CONCLUSÕES

- 1 – A espécie de arroz *Oryza glumaepatula* é colonizada por bactérias diazotróficas associativas, tanto nas raízes quanto na parte aérea;
- 2 – As áreas de mata e cerrado apresentam incidência de bactérias diazotróficas associativas em arroz *O. glumaepatula* semelhantes, porém maior diversidade genotípica ocorre entre as bactérias isoladas do cerrado;
- 3 – Maior número de bactérias diazotróficas associativas de arroz *O. glumaepatula* que apresentam produção de AIA e solubilização de fosfato de Ca ocorre na parte aérea das plantas do cerrado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acompanhamento da safra brasileira: grãos: quinto levantamento, fevereiro/2009 / Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: Conab, 2009.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagonística de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 565-568, 2002.

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.

ASSIS, M. P.; BERTONI, J. C.; CARVALHO, J. G.; SAND, F. Limitações nutricionais para a cultura do arroz em solos orgânicos sob inundação. **Ciência agropecuária**, v.25, n.2, p.299-310, mar./abr., 2001.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J.I.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.L.; HEMERLY, A.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; NOGUEIRA, E.M.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDOTTO, L.E.B.; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T. L.G.; ALVES, B.J.R.; JAMES, E.K.; JANTALIA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL M.S.; BODDEY, R.M. Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família Poaceae (antiga gramineae). In: RIBEIRO, M.R.; ARAÚJO, NASCIMENTO, C.W.; RIBEIRO FILHO, M.R.; CANTALICE, J.R.B (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. 1 ed. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2009. p.203-271.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996, 238 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – UFRRJ, Seropédica, RJ.

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

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G. & DOBEREINER, J. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **An. Acad. Bras. Ci.**, 69:116, 1997.

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

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.

BARROSO, C. B.; OLIVEIRA, L. A. Ocorrências de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio nas raízes de plantas na Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 25, p. 575-581, 2001.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Journal of Microbiology**, n.43, p. 103-121, 1997.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L.K.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.311-320, 2008.

BIN, C.; SI-PING, Z.; LI-JUAN, Z.; ZHI-MIN, L.; YA-NA, S.; Wei-Wen, Z. Genetic diversity analysis of diazotrophs in the rice rhizosphere Chinese. **Journal of Agricultural Biotechnology**, v.4, p.253–258, 2007.

BRAGA, R. M.; CORDEIRO, A. C. C.; MARIANO, F. S.; MARIANO, F. S. Perfil dos Consumidores de Arroz em Boa Vista, Roraima. Boa Vista. **Embrapa Roraima**, 2009. 24p. il. (Embrapa Roraima. Documentos, 20).

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

BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, R.P.V.; FERREIRA, M.E. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor Appl Genetics**, v.104, p.1192-1203, 2002.

BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, R.P.V.; FERREIRA, M.E. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor Appl Genetics**, v.104, p.1192-1203, 2002.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L.. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Maringá**, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHENG-HUI, X.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1435–1438, 2005.

CONAB. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento – Conab, 2009. **Acompanhamento da safra agrícola 2008/2009** – 9º Levantamento – junho/2009. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/download/safra/BOLETIM_9_Levantamento_junho2009.pdf
>. Acesso em: 21/01/2010.

CORDEIRO, A. C. C.; MOURÃO JUNIOR, M. C.; MEDEIROS, R. D. **Evolução de Área, Produção e Produtividade do Arroz Irrigado em Roraima**. Boa Vista, RR, Dezembro, 2008.

CORDEIRO, A. C. C.; RANGEL, P. H. N.; MEDEIROS, R. D. **Avaliação de Genótipos de Arroz Oriundos de Híbridação Interespecífica entre *Oryza sativa* e *Oryza glumaepatula*, em Várzea de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009.

DAS, A. C.; SAHA, D. Influence of diazotrophic inoculations on nitrogen nutrition of rice. **Australian Journal of Soil Research**, v.41, p.543-1554, 2003.

DEY, R.; PAL, K. K.; BHATT, D. M.; CHAUHAN, S. M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growthpromoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 159, p. 371-394, 2004.

DÖBEREINER, J. Azotobacter em solos ácidos. **Bol Inst Ecol Exp Agr**, v. 11, 1953. P. 1-36.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v.13, p.1-13, 1992.

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

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5285-5293, 2001.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, v.2, p.123-242, 2000.

ENRICH-PRAST, A.; ESTEVES, F. A.; BIESBOER, D. D. Actual and potential heterotrophic nitrogen fixation and detritification rates of *oryza glumaepatula* teud in an amazonian lake. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n.3, p. 477-484. 1999.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; ABALLEROMELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2790-2798, 2001.

FAOSTAT- Agriculture Data, Agricultural Production, Crops Primary, 2004. Disponível em: <<http://apps.fao.org>> Acesso: 08 de jan. 2010.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES S. L.; BALDANI J. I.; BALDANI V. L. D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 06 - 12, 2003.

FIGUEIREDO, M. V. B.; MARTINEZ, C. R.; BURITY, H. A.; CHANWAY, C. P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World J Microbiol Biotechnol**, n.24, p.1187–1193, 2008.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: Selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, set. 2004.

Germano Nunes Silva Filho(2), Charles Narloch(2) e Rosana Scharf. **Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina(1)**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, jun. 2002.

GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. Life history, reproduction and growth of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. **Botânica Marina**. n. 42, p.481-486, 1999.

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

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.42, p.393-398, 2007.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p.131. 2002.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method of growing plants without soil**. University of California, Berkeley, p.32, 1950.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 290).

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plants: hidden activities of unknown bacteria. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Dordrecht: Springer, p. 173-198, 2005.

HUTCHESON, K. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. **Journal of Theoretical Biology**, v.29, p.151-154, 1970.

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculantes for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, v. 21, n. 2, p. 561-568, 2001.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.65 p.197- 209, 2000.

KHALIQ, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, n. 96, p. 473-480, 2004.

KHAMMAS, K. M., AGERON, E., GRIMONT, P. A. D. AND KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in microbiology**, v. 140, p. 679-693, 1989.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A., AHMED, M.; OVES, M. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: current status. In: KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Ed.). **Microbial strategies for crop improvement**. Dordrecht: Springer, p. 105-132, 2009.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesiculararbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**. New York, v. 26, n. 2, p. 79-87, dez. 1997.

KOOMNOK, C.; TEAUMROONG, N.; RERKASEM, B.; LUMYONG, S. Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. **Science Asia**, v.33, p.429-435, 2007.

LODEWYCKX, C.; VANGROSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Science**, v.21, p.583-606, 2002.

LOMBARDI, M. L. C. O. Fixação Biológica Do Nitrogênio Atmosférico. **O Agrônomo**, v. 51, n.1, 1999.

MACHADO, R. F.; BARROS, A. C. S. A.; ZIMMER, P. D.; AMARAL, A. S. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. **Revista brasileira de sementes**, v.28, n.3, p. 151-160. 2006.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; OLIVEIRA, A.C. In: Arroz. BARBIERI, R.L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.185-208, 2008.

MARIANO, R. L. R; SILVEIRA E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A.R.; DONATO V. M. T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais: Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, v.1, p. 89-111, 2004.

MARTINS, P. S. Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos. **Estudos Avançados**, v.19, n.53, 2005.

MATTOS, K.A.; PÁDUA, V.M.; ROMEIRO, A.; HALLACK, L.F.; NEVES, B.C.; ULISSES, T.M.U.; BARROS, C.F.; TODESCHINI, A.R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.80, p.477-493, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**, 2ª ed., UFLA: Lavras, 2006.

NEDER, R. **Microbiologia: Manual de laboratório**. São Paulo: Nobel, 1992.

NOBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, n.2, p. 269-279, 2004.

OLIVARES, F. **Bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Boletim Informativo da SBCS, janeiro – abril, 2009.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. Construindo a história dos produtos naturais. **Multiciências**, n.7, outubro, 2006.

OMAR S. A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 211-218, nov. 1998.

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2158-2163, 2008.

PERIN, L.; SILVA, M. F.; FERREIRA, J. F.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v. 37, p.47-53, 2003.

POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v.152, p.95-103, 2001.

PRAKAMHANG, J.; MINAMISAWA, K.; TEAMTAISON, K; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.), **Applied Soil Ecology**, v.42, p.141-149, 2009.

BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, R.P.V.; FERREIRA, M.E. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated

rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theor Appl Genet.* n.104, p.1192-1203, 2002.

RANGEL, P. H. N. **Utilização de arroz silvestre e arroz vermelho na ampliação da base genética de populações do melhoramento do arroz irrigado.** Relatório Técnico. Embrapa/CNPq, 2004.

RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C.; FONSECA, J. R.; SILVA, S. C. DA; RABELO, R. R.; PEREIRA, J. A.; EMÍLIO, P. Mapeamento da distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Oryza*, com vistas à conservação dos parentes silvestres e das variedades crioulas de arroz (*O. sativa* L.). **In:** Parentes silvestres das espécies de plantas cultivadas. Brasília: MMA, 2006.

RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C.; FONSECA, J. R.; SILVA, S. C. DA; RABELO, R. R.; PEREIRA, J. A.; EMÍLIO, P. Mapeamento da distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Oryza*, com vistas à conservação dos parentes silvestres e das variedades crioulas de arroz (*O. sativa* L.). **In:** Parentes silvestres das espécies de plantas cultivadas. Brasília: MMA, 2006. Não paginado.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n.8, p. 897-906, 2001.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA J. R., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopalologica**, v. 12, p.16, 1986.

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

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1367-1380, 2007.

ROSA, M.S.; SANTOS, P.P.; VEASEY, E.A. Caracterização agromorfológica interpopulacional em *Oryza glumaepatula*. **Bragantia**, v.65, p.1-10, 2006.

ROSSOLINI, G. M.; SCHIPPAB, S.; RICCIOA, M. L.; BERLUTTIB, F.; MACASKIEC, L. E.; THALLERD, M. C. Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology CMLS. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.54, p.833-850, 1998.

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. Nogueira. Microbiota do solo e qualidade ambiental. **Instituto Agrônomo**, 2007. 312p.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplatemethod. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.282-285, 1995.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p.311-329, 2000.

SILVA, C. M.; KARASAWA, M. M. G.; VENCOSKY, R.; VEASEY, E. A. Elevada diversidade genética interpopulacional em *Oryza glumaepatula* Steud. (Poaceae) avaliada com microssatélites. **Biota Neotropica**, v.7, n.2, 2007.

SILVA, D. M.; FRIES, M. R. (in memorian); ANTONIOLLI, Z.; AITA, C.; VOSS, M.; JACQUES, R.; SEMINOTTI, J.; CARVALHO, C. A. Bactérias diazotróficas em solo cultivado com arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) diazotrophic bacteria in wetland rice cultivated soil (*Oryza sativa* L.). **Revista Brasileira Agrociência**, v.10, n. 4, p. 467-474, out-dez, 2004.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11-18, jan./mar. 2007.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1149-1152, nov. 2005.

SOUZA, G. S.; WANDER, A. E.; GAZZOLA, R.; SOUZA, R. S. Evolução da produção e do comércio internacional do arroz e projeção de preços. **Pesquisa Operacional para o Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p. 1-86, jan. a abr. de 2010.

STOLTZFUS, J.R.; SO, R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, J.K.; DE BRUIJN, F.J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, v.194, p. 25–36, 1997.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.; PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v.12, p.15-22, 1982.

TAN, Z. Y.; PENG, G. X.; XU, P. Z. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. **Chinese Science Bulletin**, v.54, p.2839-2848, 2009.

TAN, Z.; HUREK, T. ; REINHOLD-HUREK, B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, v.5, p.1009-1015, 2003.

TAN, Z.; HUREK, T.; GYANESHWAR, P.; LADHA, J. K.; REINHOLD-HUREK, B. Novel endophytes of rice form a taxonomically distinct sub-group of *Serratia marcescens*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 245-251, 2001.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnoviedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.1, p.43-49, jan. 2007.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.L.S.; RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v.293, p.11-19, 2009.

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

ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Khan, M.S.; Zaidi, A.; Musarrat, J. (Ed.) **Microbial strategies for crop improvement**. Dordrecht: Springer, p. 23-50, 2009.

ZHANG, G.X.; PENG, G.X.; WANG, E.T.; YAN, H.; YUAN, Q.H.; ZHANG, W.; LOU, X.; WU, H.; TAN, Z.Y. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus*. **Archives Microbiology**, v.189, p.431-439, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Área de Cerrado

- A – Área de cerrado local de coleta no município de Bonfim estado de Roraima.
B – *Oryza glumaepatula* em área de cerrado no município de Bonfim estado de Roraima.
C - *Oryza glumaepatula* em área de cerrado junto com a vegetação local, no município de Bonfim estado de Roraima.

A



B



C



APÊNDICE B – Área de Mata

A – Área de mata local de coleta, estado de Roraima.

B – *Oryza glumaepatula* em área de mata, estado de Roraima.

C - *Oryza glumaepatula* em área de mata, estado de Roraima.

A

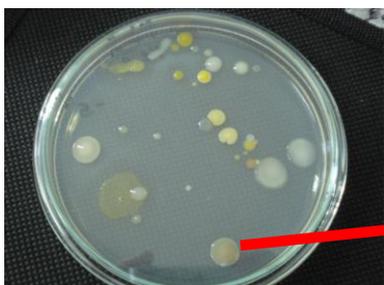


B



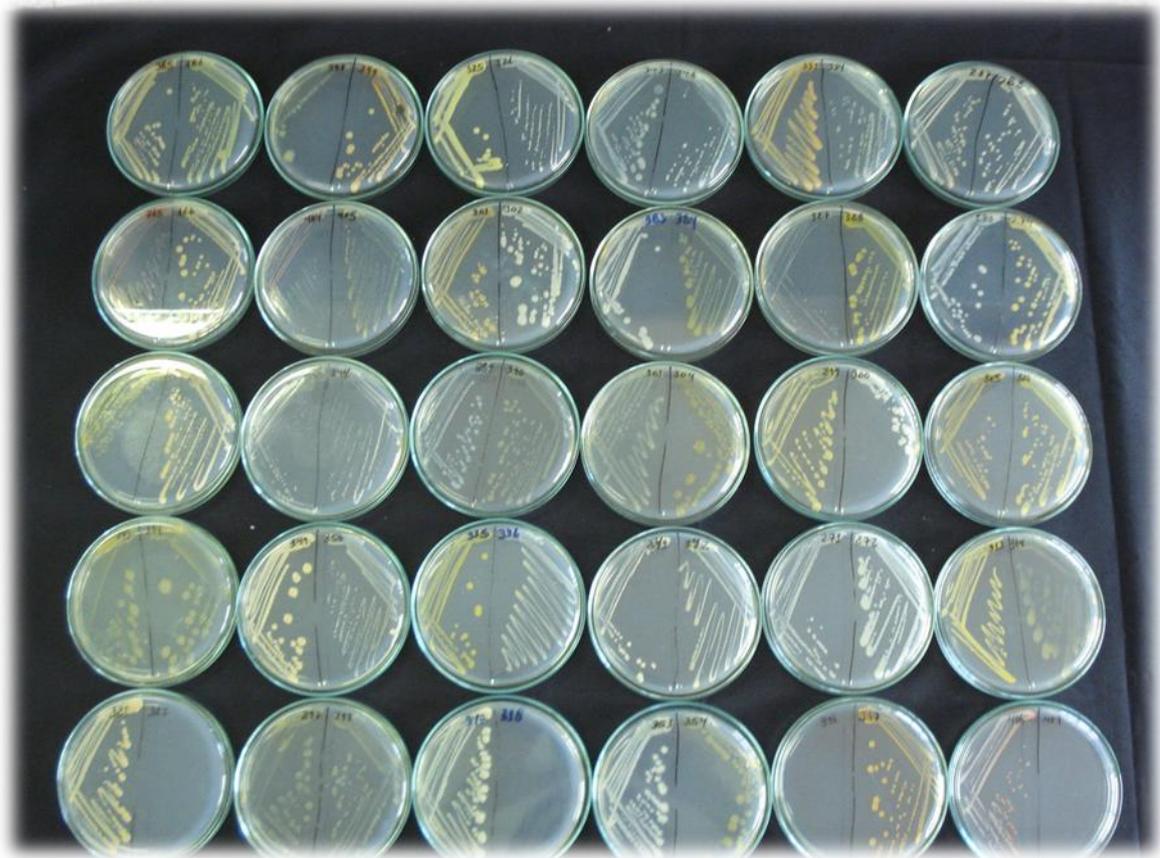
C

APÊNDICE C – Repicagem para o isolamento em meio Dyg's Placa com colônias retiradas da planta de *Oryza glumaepatula* e repicagem



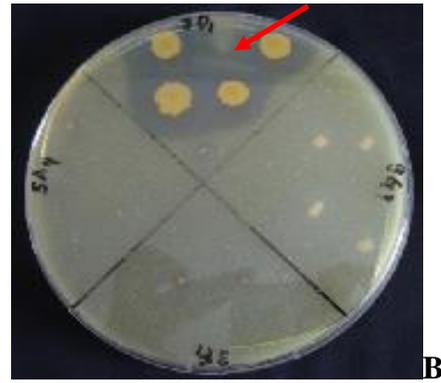
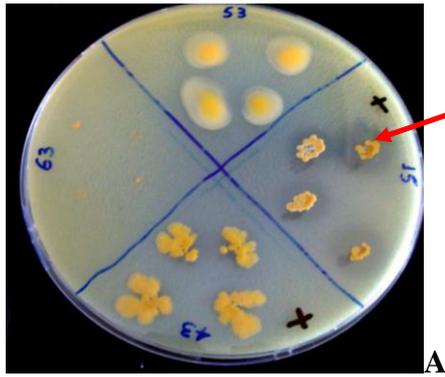
APÊNDICE D – Diversidade de Cores dos Isolados

Placas com bactérias repicadas oriundas de *Oryza glumaepatula*



APÊNDICE E – Halo formado pela solubilização de fosfato de cálcio

A – Placa mostrando o halo característico da solubilização de fosfato de cálcio



ANEXOS

ANEXO A - MEIO DE CULTURA DYGS

Reagentes

Glucose.....2.0 gr
Ácido Málico.....2.0 gr
Peptona bacteriológica.....1.5 gr
Extrato de levedura.....2.0 gr
K₂HPO₄.....0.5 gr
MgSO₄.7H₂O.....0.5 gr
Ácido glutâmico.....1.5 gr
H₂O destilada.....1000 ml

Ajustar pH para 6,5 com KOH (lentilhas)

Obs. Meio de cultura Dygs para teste de produção de Ácido Indol Acético (AIA), o pH deve ser ajustado com NaOH (pó)

Agar..... 15 gr

ANEXO B - SOLUÇÃO SALINA PARA DILUIÇÃO

Reagentes

NaCl.....0,85 gr
H₂O destilada100 mL

ANEXO C - MEIO DE CULTURA BMGM

Reagentes

Glicose..... 1,0 gr

Ácido Málico.....	2,0 gr
Manitol.....	1 gr.
K ₂ HPO ₄	0,4 gr
KH ₂ PO ₄	0,4 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 gr
CaCl ₂	0,02 gr
NaMoO ₄	0,002 gr
FeSO ₄	0,01 gr
H ₂ O destilada.....	1000 ml

Obs: em algumas situações pode ser adicionado 0,02 gr. de extrato de levedura (falar com o orientador)

Ajustar pH para 6,0 com KOH (lentilhas)

Agar:

Para meio de cultura semi sólido.....2,0 gr

ANEXO D - SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO

1. Meio de cultura

Glicose.....	10,0 gr
Extrato de levedura.....	2,0 gr
Azul de bromotimol (0.5% em 0.2N de KOH).....	5 mL
H ₂ O destilada.....	850 mL
Agar.....	15,0 gr

Ajustar pH para 6,5

2. Preparo de soluções

2.1 Solução A

K ₂ HPO ₄	5 gr.
H ₂ O.....	50 mL

2.2 Solução B

CaCl ₂	10 gr.
H ₂ O.....	100 mL

3. Preparo das placas com meio de cultura

Fundir o meio de cultura;

Adicionar em cada erlenmeyer, com o meio ainda quente, 10 mL da Solução A e 20 mL da Solução B;

Misturar com um bastão de vidro;

Verter em placas, 20 mL de meio de cultura por placa;
Usar luz germicida por 15 minutos.

4. Inoculação das bactérias

Inocular as bactérias com alça microbiológica, fazendo de 3 a 4 pontos de bactérias;
Incubar por 10 a 15 dias a 28° C;

Avaliar diâmetro da colônia e diâmetro do halo formado ao redor das colônias;

Obs: as placas podem ser divididas em 2 ou 3 partes e em cada parte inocular uma bactéria

ANEXO E - METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AIA (Ácido Indol Acético)

1. Cultivar as bactérias em meio de cultura líquido DYG'S com adição de 100 µg/mL de triptofano. Obs. Para o ajuste do pH do meio de cultura Dyg's, deve usar NaOH e não KOH. O triptofano deve ser esterilizado por filtração e adicionado ao meio de cultura na hora do uso.
2. Incubar os tubos no escuro por 48 horas, 30° C sob agitação de 150 rpm;
3. Ajustar a densidade ótica para 1, com comprimento de onda de 436 nm;
4. Retirar 1 mL de amostra, colocar em tubos para microcentrífuga e centrifugar por 5 min. a 10.000 rpm;
5. Retirar 150 µL do material em suspensão e colocar em poços de placa de ELISA, com 3 repetições;
6. Sobre as amostras, adicionar 100 µL do reagente de Salkowisk. Usar luva de látex e máscara;
7. Incubar as placas no escuro por 30 min. a temperatura ambiente;
8. Ler a absorbância das amostras em espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

ANEXO F - TAMPÃO TBE 10 X

Reagentes

Tris base.....121 gr
Ácido bórico.....55,6 gr
EDTA.....9,3 gr
Água.....1000 mL