

## **Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de cornichão e azevém**

**Adriana Ferreira Martins<sup>1</sup>, Flávio Pereira de Oliveira<sup>2</sup>, Luciano Kayser Vargas<sup>3</sup>, Gilson Schlindwein<sup>4</sup>, Bruno Brito Lisboa<sup>5</sup>, Enilson Luiz Saccol de Sá<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Departamento de Solos e Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba – DSER/CCA/UFPB, Rodovia PB 079 – km 12, Cidade Universitária, CEP 58397-000, Areia (PB) E-mail: [biol.adriana@gmail.com](mailto:biol.adriana@gmail.com)

<sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Solos e Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba – DSER/CCA/UFPB, Rodovia PB 079 – km 12, Cidade Universitária, CEP 58397-000, Areia (PB) E-mail: [pereira@cca.ufpb.br](mailto:pereira@cca.ufpb.br)

<sup>3</sup>Pesquisador da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias nº570, CEP 90130-060, Porto Alegre (RS). E-mail: [luciano-kayser@fepagro.rs.gov.br](mailto:luciano-kayser@fepagro.rs.gov.br)

<sup>4</sup>Pesquisador da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias nº570, CEP 90130-060, Porto Alegre (RS). E-mail: [gilson-schlindwein@fepagro.rs.gov.br](mailto:gilson-schlindwein@fepagro.rs.gov.br)

<sup>5</sup>Pesquisador da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias nº570, CEP 90130-060, Porto Alegre (RS). E-mail: [bruno-lisboa@fepagro.rs.gov.br](mailto:bruno-lisboa@fepagro.rs.gov.br)

<sup>6</sup>Professor Adjunto do Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Av. Bento Gonçalves nº7712, CEP 91540-000, Porto Alegre (RS). E-mail: [enilson.sa@ufrgs.br](mailto:enilson.sa@ufrgs.br)

### **Resumo**

Os rizóbios, conhecidos por sua capacidade de fixar nitrogênio em associação com leguminosas, também se mostram capazes de promover o crescimento de não-leguminosas, especialmente pela produção de ácido indol-acético (AIA). O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de rizóbios sobre a germinação e o vigor de sementes de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), bem como relacionar com a capacidade de produção de ácido indol-acético (AIA) por isolados de rizóbios. Procedeu-se à inoculação de sementes de cornichão e azevém com isolados para a avaliação dos rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas e realizou-se a determinação da produção de AIA pelos rizóbios. Nos resultados obtidos o isolado UFRGS Lu 59, mesmo produzindo concentração de AIA menor que os demais, apresentou melhor desempenho, principalmente sobre a germinação de sementes de azevém, sendo que a inoculação com rizóbios não apresentou efeito sobre o índice de velocidade de germinação de sementes de cornichão, ao contrário das sementes de azevém que apresentaram diferenças entre tratamentos. A inoculação com rizóbios que produzem baixas quantidades de AIA podem acelerar o processo de germinação das sementes de cornichão e azevém.

**Palavras-chave:** ácido indol-acético, promoção de crescimento, rizobactéria.

### **Abstract**

**Influence of rhizobial inoculation on germination and seedlings vigor of birdsfoot trefoil and ryegrass.** Rhizobia are known by their ability to fix nitrogen in symbiosis with legumes, but they are also capable of promote the growth of non-legume, mainly due to indoleacetic acid production (IAA). The objective of this study was to evaluate influence of rhizobia on seed germination and vigor birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam), as well as relate to the ability produce indole acetic acid (IAA) by populations rhizobia. Proceeded to the inoculation birdsfoot trefoil and ryegrass seed with isolates for evaluation rhizobia on seed germination and seedling vigor, and was held to determine production IAA by rhizobia. Results in the isolated Lu UFRGS 59, even producing IAA concentration lower than the others, performed better, especially on the germination of ryegrass, and inoculation with rhizobia had no effect on the rate of germination rate of seeds birdsfoot trefoil, as opposed to ryegrass showed that differences between treatments. Inoculation with rhizobia that produce low amounts of IAA can accelerate the germination of birdsfoot trefoil and ryegrass.

**Keywords:** indole acetic acid, plant growt promotion, rhizobacteria.

## Introdução

A pecuária é uma atividade de grande importância econômica para o Rio Grande do Sul (RS) e em sua maior parte está baseada em pastagens nativas (Suñé, 2006), apresentando considerável variação de espécies, principalmente de gramíneas e leguminosas, e que representa, na sua forma primária, a base alimentar para a produção extensiva de gado pela pecuária tradicional (Moojen & Maraschin, 2002).

A introdução de espécies leguminosas consorciadas com gramíneas em sistemas de melhoramento do campo nativo é vantajosa, pois aumenta a qualidade e a diversificação da dieta consumida pelos animais (Rocha et al., 2007). Assim como, melhora a disponibilidade de forragem pelo aporte de nitrogênio ao sistema por meio de sua reciclagem e transferência para a gramínea acompanhante (Pedreira, 2001). Além disso, pastagens perenes exercem efeitos agrônômicos benéficos por períodos prolongados; as gramíneas apresentam sistema radicular denso e em constante renovação, e as leguminosas contribuem com nitrogênio, tendo em vista a simbiose de rizóbios-leguminosas, que podem substituir parcialmente, ou mesmo totalmente, a adubação nitrogenada, minimizando os custos com fertilizantes e a poluição ambiental (Osório Filho, 2009). Neste contexto, é prática comum nos campos do RS, o melhoramento de pastagens através da introdução consorciada do cornichão, *Lotus corniculatus* L. (Leguminosae), com azevém, *Lolium multiflorum* Lam. (Lamiaceae).

Especificamente, o estabelecimento de pastagens é um processo que inicia na semeadura e finaliza no ponto em que as plantas estão aptas ao pastoreio. Nesse processo, as fases iniciais do desenvolvimento da planta são consideradas determinantes, uma vez que, entre a germinação da semente e o estabelecimento da plântula, ocorrem as maiores taxas de mortalidade (Harper, 1977). Além disso, o vigor da plântula é um fator crítico quando a competição por luz, nutrientes, ar e água começa a se tornar mais acentuada (Biswas et al., 2000).

A taxa de germinação e o vigor das plântulas dependem tanto de fatores genéticos inerentes à semente, quanto de práticas culturais adotadas. Dentre as práticas culturais, a inoculação com microrganismos tem recebido especial atenção nos últimos anos por se tratar de uma alternativa de baixo custo e ambientalmente favorável, constituindo-se em uma ferramenta importante para o estabelecimento de sistemas

agrícolas sustentáveis (Schlindwein et al., 2008). Alguns autores reportaram que a inoculação com bactérias promotoras de crescimento pode resultar no aumento da germinação e emergência das sementes de plantas e dentre as quais as não fixadoras de nitrogênio (Biswas et al., 2000; Wang et al., 2007). Este efeito é proporcionado por meio da produção de reguladores de crescimento vegetal, tais como auxinas por estes microrganismos (Cattelan, 1999; Mulder et al., 2005). Contudo, esses efeitos também podem ser negativos, diminuindo a taxa de germinação (Schlindwein et al., 2008).

As auxinas, especialmente o ácido indol-acético (AIA), estimula a divisão e alongação celular, e formação de pêlos radiculares e diferenciação de raízes laterais, bem como a formação de nódulos (Mulder et al., 2005). Em não-leguminosas, o AIA estimula o sistema radicular, aumentando em tamanho, massa e número de ramificações em contato com o solo (Dazzo & Yanni, 2006), melhorando a absorção de água e nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento da planta (Caballero-Mellado, 2006).

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a influência de rizóbios sobre a germinação e o vigor de sementes de cornichão e azevém, bem como relacionar com a capacidade de produção de ácido indol-acético (AIA) pelos isolados de rizóbios.

## Material e Métodos

Neste trabalho foram estudados sete isolados de rizóbios nativos noduladores de *Lotus* spp. (UFRGS Lc 5, UFRGS Lc 607, UFRGS Lc 609, UFRGS Lc 614, UFRGS Lu 56, UFRGS Lu 57 e UFRGS Lu 59) da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) obtidos por meio de seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul (Frizzo, 2007), que em estudo realizado por Martins et al. (2010) e Martins et al. (2011) se destacaram em relação à resistência a alta salinidade e a pH baixo e elevados teores de  $Al^{3+}$  tóxico, bem como na eficiência da fixação simbiótica de nitrogênio; e as estirpes de *Mesorhizobium loti* liberados para a produção de inoculantes para *Lotus corniculatus*, conhecido como cornichão, SEMIA 806 e SEMIA 816. O Experimento foi conduzido nos Laboratórios de Fitopatologia e de Tecnologia de Sementes da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Na avaliação do efeito dos isolados de rizóbios sobre a germinação de sementes de forrageiras, foram utilizadas sementes de cornichão (*Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel) e de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) submetidas previamente a desinfestação com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio por 2 minutos, seguida de cinco lavagens com água esterilizada e especificamente para as sementes de azevém, foi realizado o tratamento térmico de imersão em água destilada a 60°C por 5 minutos, para a inibição de fungos endógenos (Girardi et al., 2009). Os testes foram conduzidos em caixas de germinação em quatro repetições com 50 sementes cada, as quais foram colocadas sobre papel estéril embebido com 16 mL do caldo de culturas de cada rizóbio estudado, crescidos em meio extrato de levedura e manitol (LM), incubado por sete dias a 28°C, sob agitação constante a 100 rpm e com cerca de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Após a montagem dos testes, as sementes foram colocadas em germinadores com luz constante e temperatura de 20 °C. De modo a avaliar a influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação, foram utilizados como parâmetros a porcentagem final de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação com base nas sementes germinadas (IVG), calculado pela soma do número de sementes germinadas a cada dia, e dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da semeadura, conforme Maguire (1962). Os dados foram obtidos a partir de contagens diárias após a emergência da plântula. Ao final de doze dias, para cornichão, e quatorze dias, para azevém, o teste de germinação foi concluído. Então, de cada unidade experimental, foram avaliadas 10 plântulas quanto à massa seca e ao comprimento, da raiz e da parte aérea, com o objetivo de avaliar a influência dos rizóbios sobre o vigor de plântulas.

Para a determinação da produção de AIA pelos rizóbios, utilizou-se o procedimento descrito por Glickmann & Dessaux (1995). Os isolados foram inoculados em meio King B, enriquecido com triptofano 2.5 mM e incubados a 28 °C durante sete dias, com agitação orbital a 100 rpm. Alíquota de 1 mL foi coletada e centrifugada a 10.000 rpm por 5 min. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 500 µL do reagente Salkowski (0,5 M solução de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O em HClO<sub>4</sub> 35%) e incubados por 30 min a 28 °C, na ausência de luz. A quantificação de AIA foi realizada por meio de método colorimétrico em espectrofotômetro em comprimento de onda de 535 nm, com auxílio de

uma curva padrão confeccionada com concentrações conhecidas da forma sintética do hormônio, cujas leituras foram a base para calcular a concentração do AIA nas amostras.

Os isolados utilizados nos experimentos foram identificados com base no sequenciamento do gene do RNA ribossomal da região 16S. Os isolados das espécies de *Lotus* foram inoculados em meio TY líquido e incubados sob agitação constante a 100rpm por 48 horas a 28°C. Posteriormente, efetuou-se a extração e purificação do DNA, utilizando-se o protocolo de extração com *kit* de colunas da *Genomic DNA Extraction* Bioamerica. Para avaliação da qualidade do DNA extraído, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X em voltagem constante (70V). O carregamento do gel foi realizado preparando-se uma mistura de 6 µL de amostra de DNA mais 1µL de tampão de carregamento (*Blue Green Loading Dye I*).

Após a verificação do produto da extração, foram realizadas as amplificações dos fragmentos de DNA, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores L1401 (5' – CGG TGT GTA CAA GAC CC – 3'), U968 (5' – AAC GCG AAG AAC CTT AC – 3'). A reação de amplificação para PCR-16S continha: 2 µL de DNA molde, 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 0,25 µL de uma solução com 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de cada DNTP, 1,5 de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de DMSO, 1,25 µL de oligonucleotídeo L1401 20 mmol L<sup>-1</sup>, 1,25 µL de oligonucleotídeo U968 20 mmol L<sup>-1</sup>, 0,2 µL de Taq polimerase, e água ultra pura estéril para o volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de um minuto a 94°C, uma fase de um minuto a 56°C e uma fase de um minuto a 72°C; para extensão final procedeu-se a um ciclo extra a 72°C por cinco minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X em voltagem constante (70V). Após, os fragmentos obtidos foram encaminhados para sequenciamento ao Laboratório ATGene do Centro de Biotecnologia da UFRGS. As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados *GenBank* através do programa BLASTN (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Os resultados obtidos na avaliação do efeito dos isolados de rizóbios sobre a germinação de sementes de forrageiras, vigor de plântulas e produção de AIA foram avaliados por

meio de análise de variância (ANOVA). Comparações de médias foram efetuadas com aplicação do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2000).

## Resultados e Discussão

Observamos, na Tabela 1, os resultados obtidos com os rizóbios testados em sementes de cornichão (*Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel) quanto o seu efeito na germinação e o desenvolvimento de plântulas. Em relação à germinação inicial, os isolados UFRGS Lc 5 e UFRGS Lu 57 apresentaram valores acima de 80%, não diferindo estatisticamente com T+água (84%) e com a estirpe recomendada para inoculante SEMIA 806 (78%), sendo porénsignificativamente superior aos demais

tratamentos, incluindo T+LM com valor abaixo de 70%. Assim, a presença destes isolados foram capazes de eliminar o efeito negativo do meio de cultura líquido LM sobre a germinação inicial das sementes de cornichão. Entretanto, no que se refere à germinação final e ao índice de velocidade de germinação (IVG%), não se verificou diferença entre os tratamentos inoculados com rizóbios e os tratamentos não inoculados demonstrando que os microrganismos não ocasionaram interferência direta na germinação das sementes de cornichão. Resultado semelhante foram obtidos por Stroschein et al. (2011) avaliando o efeito da inoculação de rizóbios na germinação de sementes de arroz, onde observaram que a porcentagem de germinação final não diferiu significativamente entre os tratamentos inoculados e o controle.

**Tabela 1.** Efeito da inoculação com rizóbios sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de cornichão (*Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel).

Tratamentos	Germinação			Comprimento		Massa Seca
	Inicial	Final	IVG	Parte Aérea	Raiz	
	----- % -----			----- cm -----		- mg -
T+Água	84,0 a	86,5 a	21,3 a	1,70 d	1,69 a	25,5 b
UFRGS Lc 5	82,0 a	88,5 a	21,3 a	2,93 a	0,90 b	28,5 b
UFRGS Lc 607	71,0 b	85,0 a	20,4 a	2,31 c	0,84 b	26,5 b
UFRGS Lc 609	75,0 b	79,5 a	19,3 a	2,33 c	0,86 b	26,5 b
UFRGS Lc 614	74,0 b	83,0 a	19,8 a	2,14 c	0,58 c	31,0 a
UFRGS Lu 56	75,0 b	83,0 a	20,3 a	2,55 b	0,68 c	33,7 a
UFRGS Lu 57	81,0 a	84,5 a	20,8 a	2,47 c	0,58 c	35,2 a
UFRGS Lu 59	75,0 b	89,0 a	21,2 a	2,95 a	0,76 b	28,7 b
SEMIA 806	78,0 a	89,0 a	21,3 a	2,05 c	0,50 c	30,7 a
SEMIA 816	71,0 b	84,5 a	20,2 a	2,42 c	0,62 c	27,5 b
T+LM	64,5 b	72,5 a	17,4 a	2,19 c	0,57 c	27,7 b
Média	75,5	84,1	20,3	2,37	0,78	29,2
C.V. (%)	8,74	7,87	7,62	9,72	18,02	14,39

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: T+Água = tratamento controle não inoculado que somente recebeu água destilada estéril; T+LM = tratamento controle não inoculado que somente recebeu meio de cultura líquido LM.

A avaliação dos parâmetros de desenvolvimento de plântulas mostrou diferenças significativas entres os tratamentos testados. As plântulas inoculadas com os isolados UFRGS Lc 5 e UFRGS Lu 59 apresentaram maior crescimento da parte aérea, seguido do tratamento com o isolado UFRGS Lu 56. Já as plântulas do tratamento controle T+Água apresentaram menor crescimento da parte aérea. A influência no desenvolvimento de plântulas, de

acordo com Marchioro (2005) pode ser atribuída a mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos. Assim como, através da síntese de fitohormônios, como auxina, citocinina e giberelina. Em que, as giberelinas atuam estimulando o crescimento da parte aérea, tendo pouco efeito sobre o crescimento das raízes, enquanto que a auxina tem como principal efeito promover o crescimento de raízes (Marchioro, 2005).

Entretanto, a ação dos hormônios depende de outros mecanismos que regulam sua liberação da forma conjugada para livre entre os tecidos de reserva e as demais partes da planta (Schlindwein et al., 2008; Vargas et al., 2009).

Os rizóbios testados também apresentaram diferenças significativas na avaliação da germinação e desenvolvimento de plântulas com sementes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), como pode ser observado na

Tabela 2. A inoculação com o isolado UFRGS Lu 59 demonstrou índices de germinação superiores aos controles e demais tratamentos em sementes de azevém, com valores de 70,5% e 79,5% nas avaliações inicial e final, respectivamente. Assim como no índice de velocidade de germinação (IVG=13,9%), seguido dos isolados UFRGS Lu 56 (11,0 %) e UFRGS Lu 57 (10,6%), que também se destacaram em relação aos demais tratamentos.

**Tabela 2.** Efeito da inoculação com rizóbios sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.).

Tratamentos	Germinação			Comprimento		Massa Seca
	Inicial	Final	IVG	Parte aérea	Raiz	
	----- % -----			----- cm -----		- mg -
T+Água	27,0 c	44,5 c	6,2 c	7,78 b	5,32 a	15,25 a
UFRGS Lc 5	6,0 e	22,5 d	2,8 d	6,55 c	3,30 b	12,75 b
UFRGS Lc 607	17,0 d	25,5 d	3,7 d	6,82 c	2,95 b	13,25 b
UFRGS Lc 609	14,5 d	20,0 d	2,9 d	6,75 c	3,45 b	12,50 b
UFRGS Lc 614	5,0 e	21,0 d	2,5 d	6,82 c	2,65 b	13,50 b
UFRGS Lu 56	60,0 b	68,5 b	11,0 b	8,80 a	3,88 b	16,25 a
UFRGS Lu 57	57,5 b	66,0 b	10,6 b	8,22 b	3,02 b	16,25 a
UFRGS Lu 59	70,5 a	79,5 a	13,9 a	9,20 a	4,68 a	16,75 a
SEMIA 806	8,5 e	19,0 d	2,5 d	6,62 c	1,95 b	12,75 b
SEMIA 816	18,5 d	26,0 d	3,7 d	6,95 c	3,30 b	14,25 b
T+LM	5,0 e	21,0 d	2,5 d	5,82 c	2,92 b	13,25 b
Média	26,32	37,59	5,67	7,30	3,40	14,25
C.V.(%)	20,65	18,35	17,19	8,57	22,12	11,76

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: T+Água = tratamento controle não inoculado que somente recebeu água destilada estéril; T+LM = tratamento controle não inoculado que somente recebeu meio de cultura líquido LM.

Em relação aos parâmetros de desenvolvimento das plântulas, observamos que os isolados UFRGS Lu 59 e UFRGS Lu 56 destacam-se com os maiores valores de crescimento da parte aérea. No que diz respeito ao crescimento da raiz, novamente o isolado UFRGS Lu 59 destacou-se perante aos demais tratamentos, não diferindo estatisticamente do tratamento T+Água. Quanto à análise da massa seca das plântulas, verificamos que os isolados UFRGS Lu 59, UFRGS Lu 57 e UFRGS Lu 56, juntamente com controle T+Água, apresentaram os maiores valores, destacando-se dos demais tratamentos. Estudos comprovam a ação benéfica na atividade de promoção de crescimento vegetal em diversas espécies de plantas, a exemplo de milho, sorgo, milheto, canola, alface, mostarda, arroz, cevada (Matiru & Dakora, 2004; Perrine-Walker et al., 2007). Assim como citado para o

estudo da influência no desenvolvimento de plântulas de cornichão, podemos fazer atribuições aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos; como por exemplo, a síntese de auxinas, que promove o crescimento das raízes e a proliferação de pêlos radiculares, melhorando a absorção de água e nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento das plântulas (Caballero-Mellado et al., 2006); e trabalhos conduzidos com *Oryza sativa* (arroz) e *Trifolium alexandrinum* (trevo alexandrino) relatam a produção de giberelina (Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Yanii et al., 2001). Bloemberg & Lugtenberg (2001) e Persello-Cartieaux et al. (2003) relatam a produção de citocininas por rizóbios associados à canola (*Brassica napus*). Hormônios do grupo das giberelinas e citocininas estão relacionados com o alongamento celular e,

com isso, têm efeitos fisiológicos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (Metivier, 1986). Outros mecanismos bioquímicos, como solubilização de fosfato e produção de sideróforos, também podem ser utilizados pelos rizóbios para favorecer o crescimento de gramíneas.

Na avaliação da quantificação da produção de AIA, os rizóbios testados apresentaram diferenças quanto à capacidade de produção do fitormônio, como pode ser observado na Tabela 3. Sendo que, os isolados UFRGS Lc 5, UFRGS Lc 607, UFRGS Lc 609, UFRGS Lc 614, UFRGS Lu 56 e a estirpe SEMIA 816 destacam-se dos demais rizóbios, revelando concentração de AIA produzida no mínimo cinco vezes maior que a estirpe SEMIA 806. Resultados semelhantes foram observados por Schlindwein et al. (2008) quando avaliaram quatro isolados de *Bradyrhizobium* sp. com o isolado de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* quanto a capacidade de produzir AIA, em

que o isolado TV-13 produziu quantidade de AIA até 100 vezes maior que os demais isolados de *Bradyrhizobium*. A produção de AIA também diferiu entre isolados de rizóbios de soja com uma variação entre 1,0 a 130,3 mg AIA mL<sup>-1</sup> (Chen et al., 2002). No estudo de Kuss et al. (2007), todos os isolados produziram AIA em meio de cultura, que variou entre 2,79 e 13,47 µg mL<sup>-1</sup>, quando quantificado em meio de cultura. Stroschein et al. (2011), em seu trabalho, observaram a produção de substâncias equivalentes ao AIA em todos os dez isolados de rizóbios testados em meio de cultura, sendo que os isolados UFRGS Ms205, Ms75, Ms 55 e Ms58 produziram quantidades de AIA em meio de cultura superiores a SEMIA 816. Nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas, a inoculação de rizóbios produtores de AIA pode aumentar a velocidade da germinação das sementes inoculadas, como observado para arroz e alface (Palaniappan et al., 2010; Schlindwein et al., 2008; Vargas et al., 2009).

**Tabela 3.** Quantidades de AIA produzidas por rizóbios em meio King B enriquecido com triptofano.

Rizóbios	AIA - µg mL <sup>-1</sup> -
UFRGS Lc 5	23,1 a
UFRGS Lc 607	27,2 a
UFRGS Lc 609	28,5 a
UFRGS Lc 614	22,9 a
UFRGS Lu 56	31,2 a
UFRGS Lu 57	16,6 b
UFRGS Lu 59	10,5 b
SEMIA 806	4,2 c
SEMIA 816	24,6 a
Média	21,0
C.V.(%)	17,8

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Nos resultados obtidos nos testes de germinação e desenvolvimento das plântulas, o isolado UFRGS Lu 59, mesmo produzindo concentração de AIA menor que os demais, exceção da SEMIA 806, apresentou melhor desempenho, principalmente sobre a germinação de sementes de azevém. Segundo Biswas et al. (2000), a produção de AIA, assim como outros fitormônios, estimulam o crescimento de plantas apenas dentro de uma faixa estreita de concentração. O efeito positivo depende da quantidade de AIA produzida pela bactéria, uma vez que uma superprodução de AIA é considerada

prejudicial às plantas (Schlindwein et al., 2008). Incrementos da germinação e aumentos da velocidade de germinação de sementes inoculadas com rizóbios produtores de AIA tem sido relatado por autores como Biswas et al. (2000), Gupta et al. (2002), Pandey et al. (2005), Schlindwein et al. (2008), Vargas et al. (2009) e Osório Filho (2009) sendo esse fator importante para o estabelecimento das culturas; o aumento na germinação das sementes é um aspecto importante pois favorece a emergência das plântulas. A promoção do crescimento de plântulas inoculadas com rizóbios promotores do

crescimento foi descrita com rizóbios promotores de crescimento por Biswas et al. (2000), Vargas et al. (2009) e Stroschein et al. (2011).

Com relação à identificação dos isolados de rizóbios, os dados obtidos com base no sequenciamento do gene do RNA ribossomal da região 16S, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores L1401 e U968, após análise no *GenBank* revelou que a maioria dos isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Mesorhizobium* apresentando similaridade entre 73 e 84%, com exceção do isolado UFRGS Lc607, identificado como gênero *Rhizobium*,

apresentando similaridade de 76% (Tabela 4). Alguns autores, como Chueire et al. (2003), Stroschein et al. (2011) e Toledo et al. (2009) julgam ser importante o sequenciamento para identificação dos rizóbios nativos dos solos brasileiros visando entender as relações entre planta e simbiote. Os fragmentos obtidos neste estudo foram eficientes para o sequenciamento em relação ao requisito gênero, entretanto, se faz necessário à continuação de estudos com marcadores que consigam obter um maior grau de similaridade com as sequências disponíveis no *Genbank*.

**Tabela 4.** Identificação dos isolados com base no sequenciamento do PCR – 16S.

Isolado	Nº Acesso	Identificação	Similaridade - % -
UFRGS Lc5	HM492885.1	Uncultured <i>Mesorhizobium</i> sp.	84
UFRGS Lc607	EF364391.1	<i>Rhizobium</i> sp.	76
UFRGS Lc609	AY147203.1	<i>Mesorhizobium</i> sp.	74
UFRGS Lc614	FN436209.1	<i>Mesorhizobium</i> sp.	75
UFRGS Lu56	FN563430.1	<i>Mesorhizobium</i> sp.	73
UFRGS Lu57	AY490123.1	<i>Mesorhizobium</i> sp.	78
UFRGS Lu59	AY490123.1	<i>Mesorhizobium</i> sp.	74

### Conclusão

A inoculação com rizóbios não apresenta efeito sobre o índice de velocidade de germinação de sementes de cornichão, ao contrário das sementes de azevém que apresenta diferenças entre tratamentos.

O isolado UFRGS Lu 59, mesmo produzindo concentração de AIA menor que os demais, apresenta melhor desempenho, principalmente sobre a germinação de sementes de azevém. Os fragmentos obtidos pela amplificação parcial do gene do RNA ribossomal são eficientes para o sequenciamento de rizóbios, entretanto, se faz necessário à continuação de estudos com marcadores que consigam obter um maior grau de similaridade com as sequências disponíveis no *Genbank*.

### Referências

BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobia inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal*, Madison, n.92, p.880-886, 2000.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by

rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.343-350, 2001.

CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola y interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v.48, n.2, p.154-161, 2006.

CATTELAN, A.J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. *Embrapa Soja Documentos*, Londrina, n.139, 1999. 36p.

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

CHUIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.27, p.833-840, 2003.

DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G. The natural rhizobium-cereal crop association as an

- example of plant-bacterial interaction. IN: UPHOFF, N.; BALL, A.; FERNANDES, E.; HERREN, H.; HUSSON, O.; LAING, M.; PALM, C.; PRETTY, J.; SANCHEZ, P.; SANGINGA, N.; THIES, J. (eds). **Biological approaches to sustainable soil systems**. CRC Press Boca Raton, Washington, p.109-127, 2006.
- FERREIRA, D.F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145p.
- FRIZZO, M.L.S. **Seleção e Caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 2007. 68p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- GIRARDI, L.B.; SANTOS, R.F.; DURIGON, M.R.; MACIEL, C.G.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E.; WEBER, M.N.D. Tratamento térmico na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Lolium multiflorum* Lam. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v.4, n.2, p.905-908, 2009.
- GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.2, p.793-796, 1995.
- GUPTA, C.; DUBEY, R.; MAHESHWARI, D. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.35, n.6, p.399-405, 2002.
- HARPER, J.L. **Population biology of plants**. London: Academic, 1977. 892p.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol-acético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1459-1465, 2007.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination – and in selection for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.
- MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indolacético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; ZANIN, J. G.; LONGONI, L. S.; FRAGA, L. G. C.; SÁ, E. L. S. Resistência à salinidade de rizóbios nodulares de *Lotus* spp. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.16, p.73-79, 2010.
- MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J. A. T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A. T.; DIEMER, G. D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1855-1864, 2011.
- MATIRU, V.N.; DAKORA, F.D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in land races of African cereal crops. **African Journal Biotechnol**, Africa, v.3, n.1, p.1-7, 2004.
- METIVIER, J.R. Citocininas e giberelinas. In: FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo: EDUSP, 1986, v.2, cap.4 e 5, p.93-162.
- MOOJEN, E. L.; MARASCHIN, G. E. Potencial produtivo de uma pastagem nativa do Rio Grande do Sul submetida a níveis de oferta de forragem. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.127-132, 2002.
- MULDER, L.; HOGG, B.; BERSOULT, A.; CULLIMORE, J.V. Integration of signaling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Sweden, n.123, p.207-218, 2005.
- OSORIO FILHO, B.D. **Rizóbios eficientes em *Lotus* em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P. S.; SARAVANAN, V. S.; ANANDHAM, R.; SA, T. Isolation and characterization of

- plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.46, n.8, p.807-816, 2010.
- PANDEY, P.; KANG, S. C.; GUPTA, C. P.; MAHESHWARI, D.K. Rhizosphere competent *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 produces characteristic siderophore and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). **Current Microbiology**, New York, v.51, n.5, p.303-309, 2005.
- PEDREIRA, G.S.P.; MELLO, A.C.L.; OTANI, L. O processo de produção em pastagens. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 38, 2001, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p.772-807, 2001.
- PERRINE-WALKER, F.M.; PRAYITNO, J.; ROLFE, B. G.; WEINMAN, J. J.; HOCART, C. H. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, n.12, p.3343-3350, 2007.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobia interactions. **Plant, Cell & Environment**, v.26, n.189-199, 2003.
- ROCHA, M.G.; QUADROS, F.L.F.; GLIENKE, C.L.; CONFORTIN, C.C.; COSTA, V.G.; ROSSI, G.E. Avaliação de espécies forrageiras de inverno na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.6, p.1990-1999, 2007.
- SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alfafa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.658-664, 2008.
- STROSCHEIN, M. R. D.; SÁ, E. L. S.; MACHADO, R. G.; CABRAL, T. L.; BRUXEL, M.; GIONGO, A.; FONTOURA, R. C. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.10, p.1738-1743, 2011.
- SUÑÉ, A. D. **Metodologia de testes de germinação e de vigor para sementes de leguminosas e gramíneas nativas de importância para o bioma campo**. 2006. 346p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, p.384-391, 2009.
- VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C. E.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciências Solo**, Piracicaba, v.33, n.5, p.1227-1235, 2009.
- WANG, C.; SALDANHA, M.; SHENG, X. and others. Roles of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and glycogen in symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* with *Medicago* sp. **Microbiology**, London, n.153, p.388-398, 2007.
- YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJIN, F.; REDEMAKER, J.; MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; MATEOS, P.F.; VELASQUEZ, E.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.845-870, 2001.