



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DÁFILA DOS SANTOS LIMA FAGOTTI

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E PÓ DE ROCHAS EM
SISTEMAS AGROECOLÓGICOS DE PRODUÇÃO FAMILIAR**

DÁFILA DOS SANTOS LIMA FAGOTTI

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E PÓ DE ROCHAS EM
SISTEMAS AGROECOLÓGICOS DE PRODUÇÃO FAMILIAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F156b Fagotti, Dáfila dos Santos Lima.
Bactérias diazotróficas e pó de rochas em sistemas agroecológicos de
produção familiar / Dáfila dos Santos Lima Fagotti. – Londrina, 2012.
100 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Co-orientador: Marco Antonio Nogueira

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
2012.

Inclui bibliografia.

1. Nitrogênio – Fixação – Teses. 2. Microorganismos fixadores de
nitrogênio – Teses. 3. Ecologia agrícola – Teses. 4. Adubação verde –
Teses. 5. Milho – Adubação – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II.
Nogueira, Marco Antonio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 631.461.5

DÁFILA DOS SANTOS LIMA FAGOTTI

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E PÓ DE ROCHAS EM SISTEMAS
AGROECOLÓGICOS DE PRODUÇÃO FAMILIAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura
UEL – Londrina –PR

Prof. Dr. Osmar Rodrigues Brito
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Mariangela Hungria
Embrapa/Soja – Londrina – PR

Dr. Renan Augusto Ribeiro
Embrapa/Soja – Londrina – PR

Co-Orientador Prof. Dr. Marco Antonio
Nogueira
UEL – Londrina – PR

Londrina, 16 novembro de 2012

Dedico

A todos que me ajudaram!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sempre ilumina meu caminho.

Agradeço ao Prof. Marco que foi mais que um orientador para mim, é um grande amigo e exemplo de pessoa, me incentivou desde a graduação até agora, me deu forças e eu pude absorver cada dia um pouco de seu grande conhecimento.

Ao Prof. Galdino por aceitar me orientar sempre, me ajudando desde a graduação ao doutorado.

À Dr. Mariangela Hungria que me acolheu como se eu fosse sua orientada, outro grande exemplo de pessoa a ser seguida, profissionalmente e pessoalmente, sempre pronta a ajudar de qualquer forma.

A todos os professores e pesquisadores que ajudaram na minha formação de alguma forma.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

À Embrapa Soja pela disposição de suas dependências e auxílios para a execução deste trabalho.

À AS-PTA, principalmente ao Biólogo Fábio Júnior Pereira da Silva pelo apoio na instalação, condução das áreas experimentais e amostragens. E às famílias dos agricultores Osmindo Fuck, Wilfrid Kunzen, Valdemar, Mario Burtinik e Casimiro Naumiuk pelas áreas cedidas para realização dos experimentos.

Aos amigos que fiz nessa caminhada, são tantos que não posso citar os nomes pois não caberiam nessa folha, mas estão todos no meu coração.

A todos os colegas de laboratório, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

E por fim, à minha família, mãe e marido, que eu sei que posso contar com eles em todos os momentos, para sempre.

Um super obrigada a todos!

FAGOTTI, Dáfila dos Santos Lima. **Bactérias diazotróficas e pó de rochas em sistemas agroecológicos de produção familiar**. 2009-2012. 100f. Doutorado (Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Sistemas de produção agroecológicos são mais dependentes de processos biológicos que os convencionais. No caso do milho (*Zea mays* L.), pouco se conhece da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas, que podem contribuir com N para a planta. Esses sistemas empregam insumos de baixo custo como pós de rochas basálticas, fosfatos naturais e adubos verdes para melhorar a fertilidade do solo. Em 2009, a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas foi avaliada em áreas de produção de milho em sistemas agroecológicos e convencionais, totalizando 50 amostras. As bactérias foram isoladas em meios semi-solidificados sem N (JMV, JNFb e LGI), caracterizadas morfológica e molecularmente pelo sequenciamento do gene *RNAr 16S*. Com base no sequenciamento dos 86 isolados obtidos, foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Dyella*. Todos os isolados aumentaram a concentração de N nos meios de cultivo, a maioria produziu compostos indólicos, 70% produziu sideróforos e 22% solubilizou fosfato. Embora a maioria dos isolados estimulasse o crescimento inicial do milho *in vivo*, alguns diminuíram. Em um experimento de campo testou-se o efeito de três pós de rochas basálticas regionais e inoculação de *Azospirillum* em milho cultivado por agricultores familiares em sistemas agroecológicos. Os experimentos foram conduzidos por duas safras (2009/10 e 2010/11) em duas localidades, Cruz Machado, PR e Irineópolis, SC. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com parcelas subdivididas, com 6 tratamentos de pó de rocha em parcelas de 10 x 10 m (controle, 3 Mg/ha de cada pó de basalto - Paula Freitas, Porto União e Irati -, 1 Mg/ha de rocha fosfática -Registro, 3 Mg/ha de pó de basalto de Paula Freitas mais 1 Mg/ha de rocha fosfática) e dois sub-tratamentos com e sem inoculação do milho com *Azospirillum lipoferum* no primeiro ano e *A. brasilense* no segundo ano, em subparcelas de 5 x 10 m. Antes do cultivo do milho, no inverno, a área foi cultivada com ervilhaca (*Vicia sativa* L.) e o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) foi cultivado em consórcio com o milho no verão. A inoculação do milho com *A. brasilense* aumentou o teor foliar de N, e em alguns casos de P, em concordância com maior colonização endofítica das plantas de milho por bactérias diazotróficas na fase de florescimento pleno. Os pós de basalto tiveram efeitos sutis nos adubos verdes e nos atributos avaliados no milho, principalmente associados à rocha fosfática, como também observado para a disponibilidade de P. Não houve efeito dos tratamentos ou subtratamentos na produção de grãos, mas o potencial produtivo das plantas foi limitado pela ocorrência de déficit hídrico nos dois anos.

Palavras-chave: Fixação biológica do nitrogênio associativa. Bactérias diazotróficas endofíticas. Adubação alternativa. Milho. Adubação verde.

FAGOTTI, Dáfila dos Santos Lima. **Diazotrophic bacteria and rock powder in agroecological systems by small holders**. 2009-2012. 100p. Doutorado (Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Agroecological cropping systems are more reliant on biological processes than conventional. In maize (*Zea mays* L.), little is known on the diversity of endophytic diazotrophic bacteria, which may contribute for N nutrition. In this system, low-cost inputs like rock powder, natural phosphates and green manures are employed to improve the soil fertility. In 2009 we assessed the diversity of diazotrophic endophytic bacteria associated to maize in production areas under agroecological and conventional systems, amounting to 50 samples. Bacteria were isolated in N-free semisolidified culture media (JMV, JNFb and LGI), following morphological and molecular characterization based on sequencing of the *16S rRNA* gene. As a result, 86 obtained isolates belonged to 13 genera: *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea*, and *Dyella*. All isolates increased N-concentrations in culture medium and most produced indolic compounds, 70% produced siderophores, and 22% solubilized phosphate. Although most of isolates stimulated the initial plant growth, some decreased. In a field trial, we tested the effect of three regional basalt powders, a natural rock phosphate, and inoculation of *Azospirillum* in maize cropped by small holders under agroecological system. The trials were carried out during two growth seasons (2009/2010 and 2010/2011) in two localities, Cruz Machado PR, and Irineópolis SC. The experimental design was in randomized blocks, in split-plot arrangement, with six treatments of rock powder in 10 x 10 m parcels (control, 3 Mg/ha of each basalt powder - Paula Freitas, Irati and Cruz Machado -, 1 Mg/ha of natural rock phosphate -Registro-, 3 Mg/ha of Paula Freitas basalt powder plus 1 Mg/ha of rock phosphate), and two sub-treatments with inoculation or non-inoculation of maize with *Azospirillum lipoferum* in the first year and *A. brasilense* in the second, in 5 x 10 m sub-parcels. Before the maize crop in winter, the area was cropped with common vetch (*Vicia sativa* L.), and pigweed (*Canavalia ensiformes* L.) was intercropped with the maize crop in summer. The inoculation of *A. brasilense* in maize increased N, and in some cases, P concentrations in leaves, in agreement with higher colonization of diazotrophic bacteria in roots at the full flowering stage. There were only few effects of basalt powder on green manure and the attributes assessed in maize, mainly when associated to rock phosphate, as also observed for soil P availability. None effects of treatments or sub-treatments were observed on grain yields, but the plant potential yield was limited by drought in both years.

Key-words: Associative biological nitrogen fixation. Endophytic diazotrophic bacteria. Alternative manuring. Maize. Green manuring.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 4.1 – Histórico das áreas cultivadas com milho sob diferentes sistemas de produção, usadas para isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas | 37 |
| Tabela 4.2 – Estirpes tipo e referência que apresentaram homologia com as sequências parciais do gene <i>16S RNAr</i> dos isolados bacterianos obtidos de milho | 40 |
| Tabela 4.3 – Identificação por similaridade pela comparação das sequências parciais do gene <i>16S RNAr</i> de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de milho com as sequências depositadas no banco de dados <i>GenBank</i> | 45 |
| Tabela 4.4 – Caracterização de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, quanto à produção de compostos indólicos (estimados em AIA equivalente) com e sem triptofano, teor de N <i>in vitro</i> , solubilização de fosfato e produção de sideróforos | 58 |
| Tabela 5.1 – Resultado da análise química dos pós de rocha provenientes de Paula Freitas (PF) e de Porto União (PU)..... | 73 |
| Tabela 5.2 – Biomassa fresca e seca da ervilhaca cultivada como adubo verde de inverno em solo que recebeu pós de basalto de diferentes origens geológicas e/ou fosfato natural, na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC, na safra de 2009/10 | 75 |
| Tabela 5.3 – Teor foliar de nitrogênio (g kg^{-1}) das plantas de milho que receberam fertilização com pó de rochas e foram inoculadas ou não com <i>Azospirillum</i> spp., em experimentos conduzidos na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC | 78 |
| Tabela 5.4 – Teor foliar de fósforo (g kg^{-1}) das plantas de milho que receberam fertilização com pó de rochas e foram inoculadas ou não com <i>Azospirillum</i> spp., em experimentos conduzidos na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC | 79 |

| | |
|--|----|
| Tabela 5.5 – Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas no tecido cortical de plantas de milho que receberam fertilização com pó de rochas e foram inoculadas ou não com <i>Azospirillum</i> spp. em experimentos conduzidos na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC | 81 |
| Tabela 5.6 – Biomassa fresca e seca de feijão-de-porco cultivado nas entrelinhas da cultura de milho que recebeu fertilização com pó de rochas e foi inoculadas ou não com <i>Azospirillum</i> spp., em experimentos conduzidos na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC, na safra de 2009/10..... | 82 |
| Tabela 5.7 – Resultado da análise química de amostras de solo (0-20 cm) dos experimentos de milho após a adição de pós de basalto e fosfato natural conduzidos na região de Cruz Machado-PR..... | 83 |
| Tabela 5.8 – Resultado da análise química de amostras de solo (0-20 cm) dos experimentos de milho após a adição de pós de basalto e fosfato natural conduzidos na região de Irineópolis-SC..... | 85 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1** – Dendrograma de similaridade com base nas características morfológicas das colônias de isolados crescidos no meio JNFb, calculado pelo algoritmo UPGMA. Cor da borda: creme (*azul*); translúcida (*verde*); branco (*vermelho*). Cor do centro: creme (*azul*); branco (*verde*); amarelo (*vermelho*). Elevação: plana (*azul*); côncava (*verde*); convexa (*vermelho*). Borda: ondulada (*azul*); dentada (*verde*); inteira (*vermelho*). Detalhe óptico: brilhosa (*azul*); opaca (*verde*). Modificação do pH: alcalino (*azul*); ácido (*verde*); neutro (*vermelho*).....48
- Figura 4.2** – Dendrograma de similaridade com base nas características morfológicas das colônias de isolados crescidos no meio JMV, calculado pelo algoritmo UPGMA. Cor da borda: creme (*azul*); translúcida (*verde*); branco (*vermelho*). Cor do centro: creme (*azul*); branco (*verde*); amarelo (*vermelho*). Elevação: plana (*azul*); côncava (*verde*); convexa (*vermelho*). Borda: ondulada (*azul*); dentada (*verde*); inteira (*vermelho*). Detalhe óptico: brilhosa (*azul*); opaca (*verde*). Modificação do pH: alcalino (*azul*); ácido (*verde*); neutro (*vermelho*).....49
- Figura 4.3** – Dendrograma de similaridade com base nas características morfológicas das colônias de isolados crescidos no meio LGI, calculado pelo algoritmo UPGMA. Cor da borda: creme (*azul*); translúcida (*verde*); branco (*vermelho*). Cor do centro: creme (*azul*); branco (*verde*); amarelo (*vermelho*). Elevação: plana (*azul*); côncava (*verde*); convexa (*vermelho*). Borda: ondulada (*azul*); dentada (*verde*); inteira (*vermelho*). Detalhe óptico: brilhosa (*azul*); opaca (*verde*). Modificação do pH: alcalino (*azul*); ácido (*verde*); neutro (*vermelho*).....50
- Figura 4.4** – Frequência relativa dos gêneros de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de plantas de milho cultivadas em sistema de produção agroecológico e convencional.....51

- Figura 4.5** – Frequência relativa de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de plantas de milho em cada área de amostragem. Áreas PDC1: Plantio direto em sistema de cultivo convencional; PDC2: Plantio direto em sistema de cultivo convencional; PDA: Plantio direto em sistema de cultivo agroecológico; PCC1: Plantio convencional com queima; PCC2: Plantio convencional sem queima52
- Figura 4.6** – Árvore filogenética da classe β -*proteobacteria* mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Burkholderia*, obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene *16S RNAr* de estirpes tipo depositadas no *GenBank*. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de *bootstrap*53
- Figura 4.7** – Árvore filogenética da classe α -*proteobacteria* mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Sphingomonas*, obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene *16S RNAr* de estirpes tipo depositadas no *GenBank*. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de *bootstrap*54
- Figura 4.8** – Árvore filogenética da classe γ -*proteobacteria* mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas* e *Dyella*, obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene *16S RNAr* de estirpes tipo depositadas no *GenBank*. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de *bootstrap*55

| | |
|---|----|
| Figura 4.9 – Árvore filogenética da classe <i>γ-proteobacteria</i> mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros <i>Enterobacter</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pantoea</i> e <i>Pseudomonas</i> , obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene <i>16S RNAr</i> de estirpes tipo depositadas no <i>GenBank</i> . A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de <i>bootstrap</i> | 56 |
| Figura 4.10 – Árvore filogenética das classes <i>Actinobacteridae</i> e <i>Bacilli</i> mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros <i>Microbacterium</i> e <i>Bacillus</i> , obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene <i>16S RNAr</i> de estirpes tipo depositadas no <i>GenBank</i> . A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de <i>bootstrap</i> | 57 |
| Figura 4.11 – Formação de halo ao redor das colônias, indicando a solubilização de fosfato (A) e a produção de sideróforos (B)..... | 58 |
| Figura 4.12 – Raízes de milho inoculadas com alguns dos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas que se destacaram na avaliação do crescimento inicial de plântulas de milho..... | 61 |
| Figura 4.13 – Diferença relativa em porcentagem de atributos relacionados ao crescimento inicial de plantas de milho inoculadas com os isolados em relação ao controle sem inoculação. N=6..... | 62 |
| Figura 5.1 – Foto de satélite da área experimental em Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC. Fonte: Google Earth | 72 |
| Figura 5.2 – Aspecto da ervilhaca cultivada como adubo verde de inverno (A); Rolo-faca usado sobre a cultura da ervilhaca antes do plantio do milho (B)..... | 75 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.3 – Dados metereológicos da região de Cruz Machado-PR referentes aos meses de abril de 2009 a abril de 2011. Média mensal das temperaturas e precipitação acumulada. Fonte: Simepar | 76 |
| Figura 5.4 – Dados metereológicos da região de Irineópolis-SC referentes aos meses de abril de 2009 a abril de 2011. Média mensal das temperaturas e precipitação acumulada. Fonte: Centro de Informação de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina- Epagri | 76 |
| Figura 5.5 – Aspecto das plantas de milho inoculadas (+) ou não (-) com <i>Azospirillum brasilense</i> na área experimental de Cruz Machado, na safra 2010/2011 | 77 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 A CULTURA DO MILHO | 17 |
| 2.2 CULTIVO AGROECOLÓGICO | 18 |
| 2.2.1 Manejo de Sistemas Agroecológicos | 20 |
| 2.2.1.1 Pragas e doenças | 20 |
| 2.2.1.2 Adubo verde..... | 21 |
| 2.2.1.3 Rotação e consórcio | 23 |
| 2.3 FONTES ALTERNATIVAS DE NUTRIENTES | 24 |
| 2.3.1 Fosfatos Naturais | 25 |
| 2.3.2 Pó de Rochas Potássicas | 26 |
| 2.3.3 Fixação Biológica de N..... | 27 |
| 2.3.3.1 Bactérias diazotróficas | 28 |
| 2.3.3.2 Inoculantes..... | 30 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 33 |
| 4 ARTIGO A: DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM MILHO (ZEA MAYS L.) SOB CULTIVO CONVENCIONAL E AGROECOLÓGICO | 34 |
| 4.1 INTRODUÇÃO..... | 34 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 4.2.1 Obtenção dos Isolados..... | 36 |
| 4.2.2 Extração do DNA Genômico dos Isolados | 38 |
| 4.2.3 Amplificação e Sequenciamento do Gene 16S RNAr | 38 |
| 4.2.4 Produção de Compostos Indólicos In Vitro | 42 |
| 4.2.5 Capacidade de FBN In Vitro..... | 42 |
| 4.2.6 Solubilização de Fosfato | 43 |
| 4.2.7 Produção de Sideróforos..... | 43 |
| 4.2.8 Avaliação do Crescimento Inicial de Plântulas de Milho na Presença dos Isolados | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3 RESULTADOS | 44 |
| 4.3.1 Análises das Seqüências de 16S RNAr | 44 |
| 4.3.2 Caracterização Fenotípica das Colônias | 47 |
| 4.3.3 Ocorrência e Similaridade dos Isolados | 50 |
| 4.3.4 Produção de Compostos Indólicos e Capacidade de FBN In Vitro | 57 |
| 4.3.5 Solubilização de Fosfato e Produção de Sideróforos | 57 |
| 4.3.6 Crescimento Inicial de Plântulas de Milho Inoculadas com os Isolados | 60 |
| 4.4 DISCUSSÃO | 62 |
| 4.5 CONCLUSÕES | 68 |
| | |
| 5 ARTIGO B: AZOSPIRILLUM SPP. E PÓ DE ROCHAS NO CULTIVO DE MILHO (ZEA MAYS L.) AGROECOLÓGICO | 69 |
| 5.1 INTRODUÇÃO | 70 |
| 5.2 MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 5.3 RESULTADOS | 74 |
| 5.4 DISCUSSÃO | 86 |
| 5.5 CONCLUSÕES | 89 |
| | |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 90 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 92 |

1 INTRODUÇÃO

Os agricultores familiares do Sul do Paraná e do Planalto Norte de Santa Catarina vivem em uma realidade que têm tornado insustentável sua permanência no campo. A redução da capacidade produtiva dos sistemas agrícolas, o baixo preço dos produtos e o elevado preço dos insumos industrializados têm inviabilizado economicamente os pequenos produtores. Nesse cenário, busca-se uma alternativa de base agroecológica, com o uso de fontes alternativas de nutrientes, como os pó de rochas e a inoculação de bactérias diazotróficas, visando o restabelecimento da fertilidade do solo e a manutenção da produtividade das culturas.

Os solos mais ricos e férteis do mundo tiveram sua origem numa rocha vulcânica e extremamente dura: o basalto. Na natureza, para se formar um centímetro de solo a partir da decomposição desse tipo rocha são necessários cerca de 500 a 1200 anos, dependendo da intensidade das reações químicas e biológicas sobre a rocha mãe. O uso de pó de basalto pode recuperar solos que foram empobrecidos pelos processos de erosão, lixiviação, acidificação natural ou pela aplicação de fertilizantes químicos, e principalmente pela exportação contínua de nutrientes pelas colheitas.

A rochagem também pode empregar fosfatos naturais, utilizados como fonte de fósforo, porém de liberação mais lenta em relação ao insumo químico industrializado, que é prontamente disponível para a planta. A vantagem do uso de fosfato natural é que além de ser mais barato, também é ecologicamente mais amigável e é aceito nos sistemas de produção agroecológica.

O fornecimento de N biologicamente às culturas, mesmo gramíneas, pode ser bastante vantajoso. As bactérias diazotróficas associativas não formam nódulos ou outras estruturas especializadas para realizar a fixação biológica do nitrogênio (FBN), por isso a busca por isolados eficientes e promissores quanto à FBN associativa ou a promoção de crescimento vegetal ainda é um desafio para a pesquisa. Dentre os vários fatores que podem afetar a eficiência da FBN, o genótipo do hospedeiro pode ser de grande importância. Determinados isolados bacterianos podem apresentar certa eficiência em alguns genótipos de plantas, mas não em outras. Assim, a possibilidade de inoculação de bactérias diazotróficas associativas permite vislumbrar seu potencial na contribuição da nutrição nitrogenada de plantas

ou promoção do crescimento, sobretudo na cultura do milho, sob condições de cultivo agroecológico, em que fontes de nutrientes de alta solubilidade são vedadas.

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de milho em diferentes sistemas de produção e uso do solo. Avaliou-se ainda, em experimentos de campo, o uso de pó de basalto de três origens geológicas, um deles em combinação com fosfato de rocha como fonte alternativa de nutrientes na cultura do milho, em sistema agroecológico de produção, associados à inoculação com *Azospirillum* spp.

A primeira hipótese testada foi de que plantas cultivadas em sistemas agroecológicos apresentassem maior colonização natural por bactérias diazotróficas associativas. A segunda hipótese foi de que a inoculação com *Azospirillum* spp. associada aos pós de rocha beneficiam as plantas de milho em sistema agroecológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) tem origem na Mesoamérica (KELEMAN et al., 2009) e tem sido cultivado sob diferentes sistemas de produção (de convencional a orgânico) e manejo do solo (semeadura convencional a direta). É uma das culturas de maior importância para o Brasil, não só pela extensão da área cultivada, mas por sua diversidade de utilização, em que se destacam as alimentações animal e humana, e por sua importância socioeconômica e cultural.

Nas últimas décadas, a produção de milho no Brasil cresceu significativamente, alcançando mais de 70 milhões de toneladas na safra de 2011/12 (CUNHA NETO, 2012). Esse crescimento ocorreu devido à introdução de genótipos mais produtivos, associados a determinadas práticas culturais, como o uso de fertilizantes minerais industrializados. Outro fator foi devido ao aumento dos cultivos de segunda safra (safrinha), representando aproximadamente 7 milhões de hectares ocupados pela cultura do milho no inverno. Mesmo diante de uma supersafra em 2011/12, o mercado do milho ainda está em alta devido à grande procura pelo produto, isso porque os Estados Unidos tiveram grande parte da sua produção perdida pela estiagem ocorrida em 2012. Isso abre espaço no mercado para grandes e pequenos produtores de milho, principalmente aqueles que visam nichos específicos de mercado como os produtores agroecológicos.

No Brasil, parte da produção de milho é realizada por pequenos e médios produtores, no entanto, os rendimentos são frequentemente baixos nesses casos, em parte por causa da baixa fertilidade dos solos (MACHADO; MACHADO; FURLANI, 1998; MACHADO; FURLANI; MACHADO, 2001), com destaque para a baixa disponibilidade de nitrogênio (N) e fósforo (P). O N é um dos principais fatores limitantes da produção, por ser absorvido em maior quantidade pelas plantas e apresentar uma dinâmica muito complexa no solo (CERETTA et al., 2002) e que, em excesso, pode resultar em perdas para a atmosfera ou em profundidade no solo. Além disso, na maioria dos países tropicais, estima-se que os fertilizantes nitrogenados correspondam a 40% do custo total de produção de milho (MACHADO; MAGNAVACA, 1991).

Com o aumento da produção de milho e da demanda por nutrientes, o desenvolvimento de tecnologias que aumentem a viabilidade do sistema de cultivo de milho torna-se necessário, como por exemplo, estudos da ecologia das bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) relacionadas a esta cultura (EL ZEMRANY et al., 2007 e 2006; HUNGRIA et al., 2010). Além disso, a busca por sistemas sustentáveis de produção requerem novas pesquisas, para que se mantenha ou aumente a produção, com menores impactos no ambiente.

2.2 CULTIVO AGROECOLÓGICO

A área destinada à agricultura orgânica está crescendo rapidamente em todas as partes o mundo. De 2000 a 2009, aumentou de quase 15 milhões de hectares para 37 milhões de hectares, dos quais cerca de um terço estava distribuído entre os países em desenvolvimento (WILLER, 2011). O crescimento da área de cultivo orgânico nesses países se deu principalmente com base no aumento das exportações de alimentos orgânicos para países desenvolvidos (CRANFIELD et al., 2010; KARKI et al., 2011; WILLER, 2011). Com isso, a forte demanda dos consumidores europeus e norte-americanos que se dispõem a pagar preços mais altos por alimentos orgânicos em comparação aos produzidos convencionalmente, permite melhor remunerar os agricultores orgânicos, que geralmente têm rendimentos mais baixos com esse sistema de produção (CRANFIELD et al., 2010). Por isso, a agricultura orgânica nos países em desenvolvimento está se tornando uma ferramenta de desenvolvimento socioeconômico (WILLER, 2011). No entanto, as taxas de crescimento de produção orgânica dependem de vários fatores e variam de país para país e de região para região (CRANFIELD et al., 2010).

No estudo de Karki et al. (2011) foi realizada uma análise discriminante para identificar características socioeconômicas que distinguem os agricultores convencionais dos orgânicos. Os resultados sugeriram que os agricultores localizados a menor distância de mercados regionais, com idade mais avançada, melhor treinados, organizados em associações e com áreas maiores são mais propensos a adotar a produção orgânica. Da mesma forma, a consciência ambiental, as perspectivas de melhor mercado, benefícios econômicos e na saúde foram identificados como os principais fatores que influenciam as decisões dos agricultores quanto à conversão para a produção orgânica no Nepal. Porém, esses

fatores não correspondem aos observados no Brasil, onde normalmente, segundo Assis e Romeiro (2002), os produtores orgânicos são jovens, com pequenas propriedades e com pouco treinamento.

Caracteriza-se agroecologia como ciência surgida a partir da busca de base teórica para sistemas orgânicos de produção. Entretanto, a agricultura orgânica é uma prática agrícola cuja construção social apresenta alguns vieses que determinam que os limites teóricos da agroecologia sejam respeitados em maior ou menor grau (ASSIS; ROMEIRO, 2002).

Sendo assim, o conceito de agroecologia adota como princípios básicos a menor dependência possível de insumos externos e a conservação dos recursos naturais. Para isso, os sistemas agroecológicos procuram maximizar a reciclagem de energia e nutrientes, como forma de minimizar a perda destes recursos durante os processos produtivos, pelo uso de sistemas complexos e diversificados, que pressupõem a manutenção de policultivos anuais e perenes associados com criações. Com a diversificação, estes sistemas tomam-se mais estáveis por aumentarem a capacidade de absorver as perturbações inerentes ao processo produtivo da agricultura convencional (sobretudo as flutuações mercadológicas e climáticas), aumentando, assim, sua capacidade de autossustentação (ASSIS; ROMEIRO, 2002).

O uso do termo agroecologia tem trazido a ideia e a expectativa de uma nova agricultura capaz de fazer bem ao homem e ao ambiente e de tornar o sistema sustentável. Porém, a sustentabilidade é dirigida por várias dimensões, segundo Caporal e Costabeber (2002), são elas: ecológica, social, econômica, cultural, política e ética.

Para Altieri (2008), existem desafios a serem enfrentados para a prática de uma agricultura sustentável: a) Desafio ambiental: consiste em buscar sistemas de produção agrícola adaptados ao ambiente, minimizando a dependência de insumos externos e de recursos naturais não renováveis; b) Desafio econômico: consiste em adotar sistemas de produção que minimizem perdas e desperdícios e que apresentem lucro para o produtor; c) Desafio social: consiste em adotar sistemas de produção que assegurem geração de renda para o trabalhador rural visando garantir sua permanência no campo; d) Desafio territorial: consiste em buscar uma efetiva integração agrícola com o espaço rural, por meio da pluriatividade e da multifuncionalidade desses espaços; e) Desafio tecnológico:

consiste no desenvolvimento de novos processos produtivos nos quais as tecnologias sejam menos agressivas ambientalmente, aliadas à boa produtividade.

Assim, a emergência da agroecologia como uma nova e dinâmica ciência representa uma possibilidade para sistemas de produção mais sustentáveis e mais amigáveis social e ambientalmente. A agroecologia fornece os princípios ecológicos básicos para o estudo e o manejo de ecossistemas tanto produtivos, quanto preservadores dos recursos naturais, e que sejam culturalmente sensíveis, socialmente justos e economicamente viáveis (ALTIERI, 2008).

2.2.1 Manejo de Sistemas Agroecológicos

2.2.1.1 Pragas e doenças

Com o aumento da intensidade dos sistemas de produção, principalmente em monocultivos, aumentou-se também a incidência de novas pragas e doenças, que podem ser explicadas pelos fatores que contribuem para o crescimento da produção, como a implantação de novas áreas e a introdução de cultivares mais produtivos, mas com diferentes níveis de resistência a pragas e doenças.

Qualquer organismo que em algum momento possa causar dano aos cultivos, animais ou à propriedade, é considerado uma praga, desde os microrganismos até os mais evoluídos mamíferos. Este dano resulta na redução do rendimento ou da qualidade do produto colhido. Estima-se que 67 mil espécies de organismos considerados nocivos ataquem os cultivos agrícolas em diferentes partes do mundo, dos quais somente 5% são considerados como pragas principais (GALLO et al., 2002).

No manejo agroecológico, o conceito de “praga” não existe, mas organismos que ocupam diferentes posições nos ecossistemas. As suas populações se regulam conforme a abundância de alimentos e a existência de seus inimigos naturais. O aumento de uma das populações é uma resposta da natureza a algum desequilíbrio no sistema. As causas do surgimento de uma “praga” são numerosas, complexas e relacionadas com diferentes fatores. Há algumas décadas foram provocadas principalmente pelas profundas mudanças na agricultura, como a monocultura e a utilização de defensivos agrícolas não seletivos (FORNARI, 2002).

Para evitar as “pragas” e “doenças” nos plantios, primeiramente é importante fazer um manejo preventivo, visando ao fortalecimento das defesas internas dos agroecossistemas contra o ataque por alguma espécie indesejada. O objetivo é desenhar um conjunto de sistemas de produção integrados dentro da propriedade e em seu entorno que imite a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas para manter ou estabelecer o equilíbrio natural. Esse equilíbrio se consegue pelo plantio de espécies consorciadas, que se complementam respeitando seus ciclos, criando interações positivas, dando preferência às plantas nativas mais resistentes e adaptadas às condições locais (BURG; MAYER, 2006).

Para que o solo seja saudável, com nutrientes disponíveis e apresente diversidade biológica levando a um equilíbrio entre as espécies, são importantes (FORNARI, 2002): cobertura vegetal para a conservação do solo e da água, fornecimento periódico de matéria orgânica, rotações de cultivos e adubação verde com leguminosas e gramíneas.

2.2.1.2 Adubo verde

A adubação verde é utilizada pelos agricultores há muitos anos, em diferentes regiões do mundo, para melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos, além de interromper os ciclos de pragas e doenças. Os adubos verdes são importantes componentes dos sistemas agrícolas, promovendo o aporte de C ao solo, a ciclagem de nutrientes, a proteção do solo contra a erosão, assim como a redução da variação diurna de temperatura da camada superficial do solo, tanto pelo dossel dos adubos verdes durante o desenvolvimento vegetativo, como pelos resíduos culturais mantidos na superfície em sistema de semeadura direta (FORNARI, 2002). Além desses aspectos, quando leguminosas são utilizadas como adubos verdes, quantidades significativas de N são adicionadas ao solo pela FBN (HUNGRIA; VARGAS, 2000; ODHIAMBO; OGOLA; MADZIVHANDILA, 2010). As leguminosas também têm excepcional capacidade de utilizar fósforo (CARNEIRO et al., 2004) e potássio (K) (AMABILE et al., 1999) do solo e, assim, melhorar a disponibilidade destes nutrientes para as culturas subsequentes.

Além de atuarem na ciclagem de nutrientes, os adubos verdes também contribuem com o aumento gradativo dos teores de matéria orgânica no solo (BUERKERT; BATIONO; PIEPHO, 2001) e, quando empregados no sistema de

plântio direto, também contribuem para a manutenção da umidade e da temperatura do solo em valores mais favoráveis ao desenvolvimento das culturas comerciais em sucessão. Estudos como o de Conceição et al. (2005) evidenciam a importância do uso de leguminosas como adubos verdes para o aumento do estoque de C do solo. Já algumas espécies, por apresentarem sistema radicular profundo, como o nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.), podem promover o rompimento das camadas de compactação sub-superficiais do solo resultantes da mecanização (pé-de-grade), o que poderia se constituir em uma excelente alternativa aos atuais métodos mecânicos de subsolagem de elevado custo e consumo energético (REINERT et al., 2008). Outras funções também são observadas, por exemplo, o da ação do feijão-de-porco e da mucuna (*Mucuna pruriens* L.) como eficientes no processo de competição, alelopatia e redução do banco de sementes de plantas espontâneas (FONTANÉTTI et al., 2004).

Além dos benefícios ao solo e às culturas, o uso de leguminosas como adubos verdes nos sistemas de cultivo contribuem ainda com o aporte de N ao solo, que pode aumentar a produtividade das culturas subsequentes (SILVA et al., 2007). Esse benefício é atribuído ao aumento da disponibilidade de N no solo para as plantas, devido à FBN e à mineralização do N orgânico do solo durante a decomposição de resíduos das leguminosas (ODHIAMBO; OGOLA; MADZIVHANDILA, 2010).

A distribuição de N para as culturas subsequentes depende da espécie empregada, além de fatores relacionados ao clima, solo e manejo dos resíduos. A chave para alcançar o máximo benefício da adubação verde é a sincronização da liberação do N mineralizado dos adubos verdes com as exigências da cultura subsequente (MYERS et al., 1997).

Odhiambo, Ogola e Madzivhandila (2010) observaram que o uso de leguminosas na adubação verde como plantas de cobertura antes da instalação da cultura do milho tem o potencial de aumentar sua produção. Araújo e Almeida (1993) também observaram que a adubação verde na cultura do milho foi capaz de garantir produtividades similares às obtidas com a aplicação de 80 kg ha⁻¹ de N mineral. Com isso, a adubação verde é mais uma opção essencial para sistemas agroecológicos, visto que traz benefícios para a produção e mantém a sustentabilidade do sistema (FORNARI, 2002).

2.2.1.3 Rotação e consórcio

Da mesma forma que a adubação verde, a rotação de culturas consiste em alternar, anualmente, espécies vegetais, em uma mesma área agrícola. As espécies escolhidas devem ter, ao mesmo tempo, propósitos comercial e de recuperação do solo, visto que a monocultura ou sistemas contínuos de sucessão como por exemplo trigo (*Triticum aestivum* L.), soja (*Glycine max* L.) e milho safrinha, tendem a provocar a degradação física, química e biológica do solo e a queda da produtividade das culturas, além de proporcionar condições mais favoráveis para o desenvolvimento de doenças, pragas e plantas espontâneas.

Nesse planejamento, é necessário considerar que não basta apenas estabelecer e conduzir a melhor sequência de culturas. É necessário que o agricultor utilize todas as demais tecnologias à sua disposição, entre as quais se destacam: técnicas específicas para controle de erosão, calagem e adubação, qualidade e tratamento de sementes, época e densidade de semeadura, cultivares adaptadas, controle de plantas daninhas, pragas e doenças (GLIESSMAN, 2000).

A rotação cereal/leguminosa tem sido proposta como um meio eficaz para aumentar a produtividade de solos esgotados em sistemas com baixa entradas externas de nutrientes (BUERKERT; BATIONO; PIEPHO, 2001). Em solos arenosos e ácidos do semi-árido da África Ocidental, rotações de cereais/leguminosas à base de milho, sorgo (*Sorghum bicolor* L.), feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.) resultaram em aumentos no rendimento dos cereais e melhoras na disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente o P (BAGAYOKO et al., 2000).

Já o consórcio de culturas, também conhecido como policultivos, consiste basicamente no desenho de combinações espaciais e temporais de duas ou mais culturas numa mesma área, e tem sido apontado como fator fundamental na manutenção de pequenas propriedades agrícolas, sendo considerado componente de sistemas agrícolas mais sustentáveis (GLIESSMAN, 2000; FORNARI, 2002).

O aumento da produtividade por unidade de área é colocado como uma das principais razões para se cultivar duas ou mais culturas no sistema de consórcio (CARDOSO; NOGUEIRA; FERRAZ, 2007). Dentre esses sistemas, estão os que possibilitam a diminuição de problemas de pragas, pelo aumento da abundância e/ou diversidade de inimigos naturais.

Em um estudo com consórcio com o inhame (*Colocasia esculenta* L.), a poda da faixa do feijão-guandu (*Cajanus cajan* L.), cultivado na entrelinha, contribuiu para melhoria da fertilidade do solo pelo aporte de 6,58 t ha⁻¹ de biomassa seca e 159 kg ha⁻¹ de nitrogênio e, ainda, a ciclagem de 20 kg ha⁻¹ de fósforo, 136 kg ha⁻¹ de potássio, 64 kg ha⁻¹ de cálcio e 16 kg ha⁻¹ de magnésio (OLIVEIRA et al., 2006).

2.3 FONTES ALTERNATIVAS DE NUTRIENTES

O volume de cloreto de potássio importado no Brasil cresceu 57% em 2011; o de fosfato de amônia, 140%; e o de ureia, 85%, de acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria Química (CIRILLO, 2012). Em resumo, os macronutrientes primários, indispensáveis na fabricação de adubos, responderam pelo maior déficit na balança comercial do setor químico-industrial: US\$ 8,7 bilhões em 2011, quase o dobro do valor apurado em 2010 (US\$ 4,8 bilhões) (CIRILLO, 2012).

A restrição de macro e micronutrientes no solo é comum em diversas regiões, especialmente em sistemas de cultivo orgânico, onde o aporte de nutrientes às culturas depende, principalmente, da mineralização da matéria orgânica do solo, da decomposição de fertilizantes orgânicos aplicados e de resíduos de culturas (SHIVAY; KROGSTAD; SINGH, 2010).

A redução da capacidade produtiva dos solos é um dos grandes problemas dos agricultores familiares e uma das causas da redução da produtividade dos sistemas agrícolas. Grupos de agricultores experimentadores da região Sul do Paraná e do Planalto Norte de Santa Catarina têm utilizado a rochagem como pó de basalto e o fosfato natural associado ao manejo da biomassa da adubação verde, como uma maneira de recuperar a fertilidade química, física e biológica dos solos, resultando em manutenção da produtividade dos sistemas de produção a um baixo custo (ALMEIDA; SILVA; RALISCH, 2007).

A rochagem é definida com uma prática agrícola de incorporação de rochas ou minerais moídos ao solo, sendo a calagem e o uso de fosfato natural casos particulares desta prática (LEONARDOS; FYFE; KRONBERG, 1987). É considerada um tipo de remineralização em que o pó de rocha é utilizado para rejuvenescer solos pobres ou lixiviados. A rochagem é considerada uma tecnologia

amiga do ambiente e socialmente responsável com base no rejuvenescimento e conservação do solo, por meio de adição de pós de rocha naturais, que são ricos em cálcio, fósforo, potássio, magnésio e micronutrientes (THEODORO; LEONARDOS, 2006). Esses autores encontraram vantagens econômicas, ambientais e produtivas significativas com a rochagem em culturas de milho, arroz (*Oryza sativa* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) em comparação à adubação convencional.

2.3.1 Fosfatos Naturais

Fósforo na forma de fosfato é crucial para o metabolismo celular e todas as formas de vida dependem dele. Juntamente com o nitrogênio e o potássio constituem os macronutrientes primários, essenciais para o crescimento das plantas e sua oferta por meio dos fertilizantes químicos industrializados é um dos pilares da agricultura moderna. Porém, as reservas de fosfato de rocha usadas para produção de fertilizantes fosfatados são finitas e questões são levantadas quanto ao perigo da exaustão, pois não existe nenhum substituto para o fosfato na agricultura, o que pode representar um grande problema para um futuro próximo.

A prática de rochagem pode se configurar como uma tecnologia alternativa capaz de auxiliar na recuperação da fertilidade do solo, além de reduzir ao mínimo o uso de fertilizantes químicos, especialmente aqueles incorporados em formas altamente solúveis, como é o caso das formulações NPK. Várias pesquisas constataram que na presença de determinados tipos de rochas, a vegetação natural e a produção agrícola se apresentavam mais exuberantes (LEONARDOS; FYFE; KRONBERG, 1987; THEODORO; LEONARDOS, 2006; SHIVAY; KROGSTAD; SINGH, 2010).

Com exceção do N, todos os nutrientes de plantas têm origem geológica. A solubilização dos nutrientes das estruturas cristalinas e disponibilização às culturas é realizada pela ação do intemperismo físico, químico e biológico. Nesse último caso, por ação de plantas e dos microrganismos. A extrusão de H^+ e a excreção de ácidos orgânicos pelas raízes e microrganismos solubilizam a rede cristalina de micas, feldspatos e de outros silicatos, disponibilizando os nutrientes nelas contidos, inclusive o fosfato (HINSINGER et al., 2001).

Hinsinger et al. (2001) estudaram o efeito do sistema radicular de milho e banana (*Musa sapientum* L.) na solubilização de nutrientes de rocha basáltica moída na região de Londrina. Nesse trabalho, os autores constataram que houve aumento na solubilização de Si, Ca, Mg, Na e Fe da rocha basáltica. Ca e Fe parecem ser preferencialmente solubilizados em relação a outros elementos, sugerindo que a dissolução do plagioclásio (constituente do feldspato) é mais rápida do que a de outros constituintes do basalto estudado.

Buerkert, Bationo e Piepho (2001) observaram incrementos na produtividade de milho em rotação com leguminosas (sorgo, feijão caupi, e amendoim) e aumento do P disponível no solo, após 4 anos da aplicação de pó de rocha fosfática e, ainda, a utilização de leguminosas no sistema aumentou o teor de matéria orgânica no solo.

A utilização direta de fosfatos naturais ainda é restrita por causa da baixa reatividade, porém, já é bastante difundida na agroecologia (FORNARI, 2002). Uma maneira de aumentar a reatividade desses fosfatos é usá-los no processo de compostagem. Segundo Branco, Murgel e Cavinatto (2001), a atividade microbiana em compostos orgânicos permite a solubilização de rochas fosfáticas e o fertilizante resultante desse processo apresenta eficiência igual ou maior que a dos adubos sintéticos convencionais, a um custo de 34 a 40 % menor. Em trabalho feito com o milho, a adubação com o fosfato de rocha aumentou significativamente a produção de grãos e o teor foliar de fósforo, igualando ao superfosfato e, ainda, a cultura foi mais tolerante ao déficit hídrico (ARAÚJO; ALMEIDA, 1993).

2.3.2 Pó de Rochas Potássicas

Com relação às fontes, em quase todo o Brasil o potássio consumido na agricultura está na forma de cloreto de potássio, solúvel em água. No entanto, há um grande número de minerais de rochas contendo esse nutriente, porém não há muitos trabalhos científicos sobre o uso desse tipo de rocha na agricultura.

O uso de pó de rochas como fertilizante é referenciado positivamente em alguns trabalhos sobre agricultura familiar (THEODORO; LEONARDOS, 2006; FYFE; LEONARDOS; THEODORO, 2006). Fornari (2002) cita várias rochas que podem fornecer K, como a silvita, leonita, silvinita, glasrita,

carnalita, langbeinita, singenita, polianita e cainita. Dentre essas, a mais rica em K é a silvita (63,2%) e a mais pobre a polianita (15,5%).

A riqueza representada pela constituição mineral dos resíduos de beneficiamento de rochas ornamentais chama atenção pelas possibilidades de utilização na agricultura. Bertossi et al. (2011) relatam a possibilidade de utilização destes resíduos no processo de rochagem, no qual o pó de rocha é agregado ao solo para corrigir acidez e enriquecimento mineral, principalmente de K. Porém, o pleno aproveitamento desses minerais somente é possível com outras práticas que aumentam a atividade biológica do solo, como a compostagem, uso de fertilizantes orgânicos, adubação verde, manejo das plantas espontâneas, cobertura morta, entre outras (ARAÚJO; ALMEIDA, 1993). No caso das fontes de baixa solubilidade, a liberação dos nutrientes pode ser favorecida pela adição dessas fontes no processo de compostagem de resíduo orgânicos (BRANCO; MURGEL; CAVINATTO, 2001).

2.3.3 Fixação Biológica de N

O consumo de fertilizantes nitrogenados no mundo cresceu nos últimos anos, assim como no Brasil. Hoje o país importa 66% da ureia que consome e 70% da amônia, ou seja, há um grande mercado de amônia e ureia no Brasil (SAMORA, 2012), porém, a elevados custos.

Assim, o aumento do custo dos fertilizantes nitrogenados e a preocupação cada vez maior com possíveis efeitos negativos do excesso de nitrato nos mananciais e gases de efeito estufa na atmosfera são fatores que devem ser levados em consideração para o incentivo ao estudo do processo natural de FBN (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009). Todas as possibilidades de incremento da FBN na agricultura devem ser exploradas, não somente como alternativa econômica, mas também ecológica (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008).

O N é o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas, e geralmente encontrado em baixas concentrações nos solos brasileiros. Para o cultivo de milho, dependendo da produtividade esperada, são exigidos 120 kg ha⁻¹ de N ou mais. Frente ao grande aumento dos custos dos insumos ocorrido recentemente, esse custo fica proibitivo para pequenos produtores. Além disso, fontes sintéticas de fertilizantes não podem ser usadas nos sistemas agroecológicos

de produção. Nesse caso, as fontes de N são provenientes principalmente da biomassa de plantas leguminosas e gramíneas usadas no consórcio ou sucessão com as culturas principais, enquanto P, Ca, Mg, K e micronutrientes são fornecidos por pós de rocha de baixa solubilidade, como visto anteriormente. Além do fornecimento de N orgânico pela biomassa das plantas, outro ponto fundamental para a incorporação de N no sistema agrícola é a FBN, realizada por bactérias diazotróficas, que disponibilizam o N já na forma absorvível pelas plantas.

2.3.3.1 Bactérias diazotróficas

Bactérias denominadas diazotróficas são aquelas que fixam o N atmosférico (N_2) e o transformam em amônia (NH_3) e na sequência em íons amônio (NH_4^+) que podem ser assimilados tanto pelos microrganismos quanto pelas plantas. Diferentemente das bactérias generalistamente denominadas rizóbios, que são simbióticas, as diazotróficas associativas não formam nódulos ou outras estruturas especializadas para realizar a FBN. Geralmente colonizam a rizosfera ou a endorrizosfera da planta, realizando a fixação no local onde estão. Podem viver em meio com oxigênio, porém, apenas realizam a fixação quando estão em ambiente microaerofílico (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009). Essas bactérias geralmente se encontram associadas a plantas não-leguminosas, como é o caso do milho, objeto desse estudo.

O *Azospirillum* representa o gênero de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas mais bem caracterizado (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Foi inicialmente isolado por Beijerinck, em 1923, de um solo arenoso e pobre em nitrogênio na Holanda e primeiramente designado *Spirillum lipoferum*. Na década de 70, Döbereiner isolou essa bactéria e constatou sua ampla distribuição na rizosfera de inúmeras gramíneas tropicais. Tarrand, Krieg e Döbereiner (1978) propuseram o gênero *Azospirillum* e separou-o em duas espécies, *A. brasilense* e *A. lipoferum*. Desde então, novas espécies têm sido descritas, como por exemplo, *A. amazonense* e *A. halopraeferans* (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Atualmente são conhecidas quinze espécies do gênero de *Azospirillum* (LIN et al., 2012), dentre as quais *A. lipoferum* e *A. brasilense* são as mais estudadas (RAMOS et al., 2002; SPAEPEN et al., 2008; HUNGRIA et al., 2010).

Outras bactérias diazotróficas frequentemente encontradas em associação com as raízes das plantas não leguminosas incluem *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium* spp., *Azoarcus* spp., *Azotobacter* spp. *Burkholderia* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* (KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKÉS, 2004). Dentre essas espécies, *A. diazotrophicus*, *H. seropedicae* e *Azoarcus* sp. são bactérias diazotróficas endofíticas, ou seja, vivem dentro da planta sem causar nenhuma alteração fisiológica no hospedeiro. Em milho, diversos são os gêneros de bactérias diazotróficas associadas, como por exemplo: *Burkholderia* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Sphingomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Xanthomonas* sp. e *Klebsiella* spp. (CHELIUS; TRIPLETT 2001; PARK et al. 2005; ROESCH et al. 2008).

Os benefícios da inoculação de plantas com *Azospirillum* relatados na literatura são diversos (DOBBELAERE et al., 2001; EL ZEMRANY et al., 2006; HUNGRIA et al., 2010). Esta diazotrófica pode contribuir com o aumento da massa seca total da planta, aumento da quantidade de N da parte aérea e dos grãos, florescimento precoce, aumento da produção e peso específico de grãos, aumento da altura das plantas, comprimento das folhas, aumento da germinação das sementes e maior desenvolvimento do sistema radicular (BASHAN; LEVANONY, 1990; DOBBELAERE et al., 2001). Estes benefícios podem ocorrer graças à fixação de N e à produção de fitormônios por esta bactéria, além de outros efeitos promotores de crescimento.

Além de fixar o N₂, as bactérias diazotróficas podem estimular o crescimento vegetal por mecanismos diretos e indiretos (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003). Dentre os mecanismos de ação direta estão: FBN, solubilização de fosfatos e produção de hormônios vegetais, como ácido-indolacético, giberelinas e citocininas. Já os mecanismos de ação indireta são: produção de antibióticos, antagonismo a fitopatógenos, indução de resistência sistêmica nos vegetais e produção de sideróforos (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; KUSS et al., 2007; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

A habilidade de sintetizar fitormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas a plantas. Entre eles, o ácido indolacético (AIA) é conhecido por produzir tanto efeitos rápidos na planta (aumento da alongação celular) como lentos (divisão e diferenciação celular) (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003). Existem pelo menos três vias para biossíntese do AIA em *A. brasilense*: duas

triptofano (Trp) dependentes, a via ácido indole-3-pirúvico e a via indole-3-acetamida, e uma via Trp independente. A ocorrência de uma via biossintética não usando Trp como precursor do AIA é altamente incomum em bactérias. No entanto, a chave destas vias está na enzima descarboxilase indole-3-piruvato (codificada pelo gene *ipdC*), que é crucial na biossíntese AIA (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; SPAEPEN et al., 2008).

A solubilização de fosfatos insolúveis na rizosfera também é um dos modos mais comuns de ação de promoção de crescimento vegetal por bactérias (RODRIGUEZ et al., 2006) e sua utilização pode contribuir para a nutrição das culturas agrícolas, principalmente quando associadas a outros fatores de crescimento, como a FBN. A produção de sideróforos por bactérias diazotróficas também é uma característica desejável, visto que esses compostos quelam o ferro. O ion ferro Fe^{3+} tem muito pouca solubilidade a pH próximo à neutralidade e, portanto, não pode ser utilizado pelos organismos nessa forma. Os sideróforos dissolvem estes ions a complexos de Fe^{3+} , que podem ser assimilados por mecanismos de transporte ativo (RÖMHELD, 1987) e assim o ferro fica indisponível para os outros microrganismos.

Um isolado microbiano que possa ter todas essas características é desejável, pois, além de promover o crescimento da planta, também pode diminuir a demanda por fertilizante nitrogenado e aplicações de defensivos agrícolas que aumentam custos de produção e impactam o ambiente.

2.3.3.2 Inoculantes

A busca por isolados eficientes e promissores quanto à FBN associativa ainda é um desafio para a pesquisa com inoculantes. Isolados bacterianos que se mostram eficientes em algumas situações não necessariamente são eficientes em outras, levando ao insucesso da inoculação. Dentre os vários fatores que podem afetar a eficiência da FBN, o genótipo do hospedeiro pode ser de grande importância. Determinados isolados bacterianos podem apresentar certa eficiência em alguns genótipos de plantas, como o milho, mas não em outros (MIYAUCHI et al., 2008).

Por outro lado, algumas bactérias são capazes de colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, facilitando o tipo de aplicação do produto a ser

inoculado, que pode ser tanto na semente quanto no solo. Porém, a maneira como as bactérias aderem às raízes e como penetram nos espaços intercelulares ainda é pouco conhecida. Ramos et al. (2002) monitoraram *A. brasilense* em plantas de trigo e verificaram maior ocorrência dessas bactérias nos sítios de emergência de raízes laterais, confirmando a suposição de que tais bactérias penetram na raiz através de rupturas na epiderme nos pontos de emergência de raízes laterais. Estas regiões concentram mais exsudatos, o que atrai as bactérias àquele local.

Sood (2003) demonstrou a existência de quimiotaxia positiva das bactérias promotoras de crescimento de plantas a substâncias exsudadas pelas raízes, como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Além disso, nesse mesmo trabalho, a quimiotaxia por raízes micorrizadas foi superior à por raízes não micorrizadas, demonstrando a existência de comunicação entre bactérias móveis e raízes micorrizadas. A quimiotaxia pode ser afetada por diversos fatores ambientais, como a disponibilidade de água no solo, temperatura e pH, sendo o primeiro o mais importante fator que pode afetar tanto a motilidade das bactérias quanto a exsudação radicular.

Assim, pode-se esperar que diferentes genótipos de plantas, mesmo variedades da mesma espécie, apresentem diferentes capacidades de se deixar colonizar por microrganismos (MIYAUCHI et al., 2008). Como resultado disso, testes em condições de cultivo se fazem necessários antes que determinado isolado possa ser recomendado para uso. Além disso, as áreas de cultivo, sobretudo as sob sistemas agroecológicos, podem ser uma fonte para a prospecção de bactérias envolvidas na FBN associativa.

Já existe no mercado interno e externo brasileiro diferentes marcas de inoculantes para milho e trigo. No Brasil, a maioria dos inoculantes carrega duas estirpes de *A. brasilense* (AbV5 e AbV6), cujos benefícios permitem reduzir cerca de 25% da adubação nitrogenada para milho e 50% para o trigo (HUNGRIA et al., 2010).

Assim, a possibilidade de inoculação de bactérias diazotróficas associativas permite vislumbrar seu potencial na contribuição da nutrição nitrogenada de plantas, sobretudo o milho, sob condições de cultivo agroecológico, em que fontes de nutrientes de alta solubilidade não podem ser empregadas. Os benefícios dessa tecnologia não são apenas econômicos, mas também ambientais,

além de vir de encontro aos anseios almejados para o manejo de áreas sob agroecologia.

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos 8 anos, aproximadamente 380 famílias do Sul do Paraná e Planalto Norte de Santa Catarina vêm desenvolvendo experiências com a utilização de pó de basalto associado ao manejo da biomassa de adubação verde e plantas espontâneas. Estas famílias fazem parte de 33 grupos de agricultores experimentadores de 42 comunidades. Os primeiros resultados obtidos pelos agricultores são positivos e mostram a viabilidade do uso de pó de basalto na recuperação da capacidade produtiva do solo a um baixo custo em sistemas agroecológicos de produção.

Apesar do potencial de promoção de crescimento vegetal e do fornecimento de nitrogênio biologicamente a gramíneas, há um grande desafio no que se refere ao uso dessa tecnologia em condições de campo. Ademais, os sistemas de produção agroecológicos demandam tecnologias que visem aumentar os níveis de produtividades das culturas sem aumentar os custos de produção, pelo uso de recursos naturais com baixo ou nenhum custo ambiental.

4 ARTIGO A:

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM MILHO (*Zea mays* L.) SOB CULTIVO CONVENCIONAL E AGROECOLÓGICO

Resumo: Diferentes gêneros de bactérias diazotróficas, além de fixar N₂ atmosférico, também promovem o crescimento de plantas pela produção de hormônios vegetais e disponibilização de outros nutrientes. O conhecimento da biodiversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em sistemas de produção agroecológicos pode auxiliar a compreender a sustentabilidade desses sistemas. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias diazotróficas endofíticas obtidas de plantas de milho (*Zea mays* L.) sob diferentes sistemas de manejo/produção como: plantio direto e convencional, cultivo agroecológico e cultivo convencional. Os isolados foram obtidos a partir da inoculação de uma suspensão obtida do macerado da região basal do colmo do milho em meios de cultura sem N (LGI, JNFb e JMV), totalizando 86 isolados. Foi realizada a caracterização fenotípica das colônias e a sua caracterização pelo sequenciamento do gene *16S RNAr*, sendo encontradas bactérias dos gêneros *Burkholderia* spp., *Agrobacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Pseudoxanthomonas* sp., *Microbacterium* spp., *Sphingomonas* sp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Xanthomonas* sp., *Leclercia* sp., *Pantoea* spp., *Dyella* sp. e *Pseudomonas* sp. Todos os isolados aumentaram a concentração de N nos meios de cultura, variando entre 5,6 a 37,8 µg mL⁻¹. A maioria produziu compostos indólicos (0,07-26,95 µg mL⁻¹) e sideróforos (0,4-48,4 mm de halo) *in vitro*. Apenas 21 isolados foram capazes de solubilizar fostato (1,8-11,2 mm de halo). Alguns isolados, quando inoculados em sementes de milho, promoveram seu maior crescimento inicial *in vivo*, mas alguns promoveram efeito negativo. O gênero *Burkholderia*, além de conter o isolado que mais produziu sideróforo e solubilizou fostato, representou 30% dos isolados, seguido de *Agrobacterium*, com 14%. O milho sob cultivo agroecológico apresentou maior quantidade de isolados de bactérias endofíticas (24%). Assim, sistemas que sofrem menos ações antrópicas são ideais para isolamento de novos isolados bacterianos, não só visando FBN, mas também com características envolvidas na promoção de crescimento de plantas. Foram encontrados três isolados, dois do gênero *Burkholderia* e um *Stenotrophomonas* com potencial de promoção de crescimento em milho.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Plantio direto. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Gene *16S RNAr*.

4.1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio em não-leguminosas já é estudada por diversos autores (BODDEY et al., 2003; CABALLERO-MELLADO et al., 2007; SHU et al., 2012), e um crescente interesse pela utilização de bactérias diazotróficas como inoculantes em milho tem sido observada (CHELIUS; TRIPLETT, 2001;

MIYAUCHI et al., 2008; HUNGRIA et al., 2010; MONTAÑEZ et al., 2012). Estudos sobre diversidade bacteriana em sistemas agrícolas são frequentes, porém na maioria das vezes, são realizados em sistemas convencionais de cultivo, dependentes de aportes externos de insumos (TEIXEIRA et al., 2007; KUSS et al., 2007; ROESCH et al., 2008).

Várias espécies de bactérias fixadoras de N em não leguminosas foram identificadas, tais como *Acetobacter* spp., *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Enterobacter* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Pseudomonas* spp. (BODDEY et al., 2003; KENNEDY et al., 2004; PARK et al., 2005), sendo que alguns desses gêneros são patógenos para plantas e animais. Denominadas de bactérias diazotróficas pela capacidade de realizar fixação biológica de N (FBN), são capazes de colonizar a rizosfera e/ou toda a planta e de se estabelecerem dentro de nichos protegidos do excesso de oxigênio ou de outros fatores, o que lhes permite expressar a capacidade de fixar o N biologicamente (KENNEDY et al., 2004). Além dessas espécies reconhecidas como fixadoras, outros gêneros de bactérias também são encontrados em associação com milho, por exemplo, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, entre outros (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; CIBICHAKRAVARTHY et al., 2012; SHU et al., 2012).

As bactérias diazotróficas também podem estimular o crescimento vegetal por mecanismos diretos e indiretos. Dentre os mecanismos diretos estão: FBN, solubilização de fosfatos e produção de hormônios vegetais, como ácido-indolacético, giberelinas e citocininas. Já os mecanismos indiretos são: produção de antibióticos e antagonismo a fitopatógenos, indução de resistência sistêmica no hospedeiro e produção de sideróforos (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; KENNEDY et al., 2004). Isolar microrganismos que exibam essa combinação de mecanismos (PARK et al., 2005; CABALLERO-MELLADO et al., 2007; BENEDUZI et al., 2008) pode ser de grande interesse, uma vez que podem contribuir para diminuir as exigências de fertilizantes químicos, bem como pesticidas, resultando em benefícios econômicos e ambientais (BODDEY et al., 2003; MIYAUCHI et al., 2008; HUNGRIA et al., 2010).

Assim, o conhecimento sobre a diversidade de bactérias associativas em sistemas de produção permite aumentar o potencial de aplicação de seus benefícios (SHU et al., 2012). Esses mesmos autores relatam que a

diversidade de bactérias diazotróficas em solos sob manejo orgânico foi cinco vezes maior que em solos sob manejo convencional. Embora seja consenso que em sistemas de produção conservacionistas haja maior interação entre plantas e microrganismos, há poucos estudos sobre diversidade e abundância de bactérias diazotróficas endofíticas em sistemas agroecológicos de produção de milho.

O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias diazotróficas endofíticas de milho cultivado em sistema convencional e agroecológico, com base no sequenciamento do gene *16S RNAr* para identificação taxonômica e avaliar parâmetros referentes à produção de auxinas, sideróforos, solubilização de fosfato, fixação de N_2 *in vitro* e crescimento inicial em plântulas de milho

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção dos Isolados

O isolamento das bactérias foi realizado em março de 2009 a partir de amostras da região basal do colmo das plantas de milho cultivadas em diferentes sistemas de produção (Tabela 4.1). A altitude média das cinco áreas amostradas varia entre 753-765 m. O clima na região é subtropical úmido (Köppen), apresentando verões suaves e invernos com geadas severas e frequentes; com chuva em todas as estações (1.530-1.700 mm/ano); as temperaturas médias extremas podem variar entre 38 °C e -5 °C.

Tabela 4.1 – Histórico das áreas cultivadas com milho sob diferentes sistemas de produção, usadas para isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas.

| Área | Cidade/ Estado | Coordenada | Variedade | Semeadura | Pó de Rocha | Sistema |
|-------------------|------------------------------|--|-------------------|---|--|---|
| PDC1 e PDC2 | Canoinhas SC | 26°12' 55.92" S 50°34' 2.62" O | Caiano | Direta sob a palha de ervilhaca (1º ano de adoção) | 1 Mg ha ⁻¹ (pó de basalto) | Convencional |
| PDA | Porto União SC | 26°18' 23.48" S 51°10' 5.57" O | Fortuna | Direta sob a palha de aveia preta mais ervilhaca (8anos de adoção) | 1 Mg ha ⁻¹ (pó de basalto) | Agroecológico (3 anos de adoção) |
| PCC1 e PCC2 | São João do Triunfo PR | 25°36' 13.32" S 50°22' 40.88" O | Amarelo antigo | Convencional | - | Convencional (roçada manual e fogo/ tração animal) |

De cada área foram coletadas amostras da região do colo (5 - 8 cm) de dez plantas de milho no estágio de florescimento pleno, em cinco pontos de cada área, totalizando 50 amostras. As amostras foram lavadas em água corrente, tiveram a superfície desinfestada com álcool 70% (3 min) e hipoclorito de sódio comercial a 20% (5 min), e em seguida colocadas em uma solução tampão fosfato (0,05 M) e enxaguadas em água estéril. Amostras de 10 g do tecido cortical de duas plantas por ponto coletado foram maceradas em 90 mL de solução NaCl 0,85% estéril. Alíquotas de 50 µL do macerado foram inoculadas em frascos contendo 5 mL dos meios semi-sólidos LGI, JNFb e JMV (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007), em duplicata para cada meio de cultura, com a seguinte composição:

(A) LGI: 5,0 g de sacarose como fonte de C; 0,2 g K₂PO₄; 0,6 g KH₂PO₄; 0,2 g MgSO₄.2H₂O; 0,02 g de CaCl₂.2H₂O; 0,002 g de Na₂Mo₄.2H₂O; 5 mL de solução de azul de bromotimol (0,5% em KOH 0,2 N); 4 mL FeEDTA (solução 1,64%); 1 mL de solução de vitaminas (10 mg Biotina, 20 mg piridoxol-HCl), pH 6,2.

(B) JNFb: 5,0 g de ácido málico como fonte de C; 0,6 g K₂HPO₄; 1,8 g KH₂PO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de NaCl; 0,02 g de CaCl₂.2H₂O; 2 mL de solução de micronutrientes (0,04 g CuSO₄.5H₂O; 1,20 g ZnSO₄.7H₂O; 1,40 g H₃BO₃; 1,00 g de Na₂MoO₄ 0,2 H₂O; 1,175 g MnSO₄H₂O); 2 mL azul de

bromotimol (0,5% em KOH 0,2 N); 4 mL FeEDTA (idem ao LGI); 1 mL de solução de vitaminas (idem ao LGI); 4,5 g de KOH, pH 5,8.

(C) JMV: 5,0 g de manitol como fonte de C; 0,6 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de NaCl; 0,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 mL de azul de bromotimol (0,5% em KOH 0,2 N); 2 mL de solução de micronutrientes (idem ao JNFb); 4 mL FeEDTA (idem ao LGI); 1 mL de solução de vitaminas (idem ao LGI), pH 4,2.

Após incubação durante 7 dias a 30 °C no escuro, os frascos mostrando o crescimento típico de bactérias diazotróficas foram utilizados para o isolamento após quatro reinoculações sequenciais no mesmo meio de cultura (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). Após essa etapa, as culturas foram riscadas no respectivo meio solidificado para obter colônias isoladas que foram utilizadas para a caracterização fenotípica (cor da colônia e da borda, tipo de borda, tipo de elevação e mudança no pH) (HOLT et al., 1994; PARK et al., 2005). Foi feito um dendrograma de semelhança com as características morfológicas da colônia dos isolados obtidos para cada meio avaliado (JNFb, JMV e LGI), calculado pelo algoritmo UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973) utilizando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, versão 4.6).

4.2.2 Extração do DNA Genômico dos Isolados

Os isolados foram cultivados em meio Dygs líquido (6,0 g de glicose; 1,5 g peptona bacteriológica; 2,0 g extrato de levedura; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,5 g de ácido glutâmico; pH 6,0) (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007) por 24 h e centrifugados. O pellet bacteriano foi utilizado para a extração do DNA genômico com o Kit D3350-02 (Omega bio-tek, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de DNA o marcador molecular 1 kb Plus DNA LadderTM (Invitrogen, Brasil) e coloração com brometo de etídio 0,00005%.

4.2.3 Amplificação e Sequenciamento do Gene 16S RNAr

O DNA de cada isolado bacteriano foi amplificado com os oligonucleotídeos universais fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-

AAGGAGGTG ATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991). O volume final da PCR foi de 50 μ L, sendo 36,3 μ L de água ultrapura, 5 μ L de Tampão 10X (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, KCl 50 mM); 3 μ L dNTP (Invitrogen, Brasil); 1,5 μ L de MgCl₂ (3 mM); 1,5 μ L de cada primer fD1 e rD1; 0,2 μ L (1 U) de Taq polimerase (Invitrogen, Brasil); e 1 μ L (20 ng/ μ L) de DNA genômico. A temperatura do ciclo da amplificação foi 95 °C por 2 min; seguindo de 30 ciclos de desnaturação de 94 °C por 15 seg; 93 °C por 45 seg; anelamento 55 °C por 45 seg; e extensão 72 °C por 5 min; em Termociclador DNA Engine gradient cyler (Research INC, USA) (MENNA et al., 2006).

Para a purificação dos produtos de PCR, o kit de purificação PCR PureLink™ (Invitrogen, Brasil) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. A concentração da amostra foi verificada por electroforese de 2 μ L de produtos de PCR em gel de agarose a 1% e coloração com brometo de etídio 0,00005%.

Produtos purificados de PCR de cada isolado bacteriano (80 ng por reação) receberam uma mistura de 3 mL do corante DYEnamic ET (reagente de terminação para o MEGA BACE, Amersham Biosciences) e 3 pmol de cada iniciador: fD1, 362f (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3'), 786f (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3'), (5'-GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC-3') e Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991; MENNA et al., 2006). O seguinte programa foi utilizado para todos os iniciadores: desnaturação a 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 seg; anelamento 50 °C por 4 seg e extensão a 60 °C por 4 min. O sequenciamento foi analisado no sequenciador capilar MEGA BACE 1000 (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Sequências de alta qualidade foram obtidas para cada estirpe e reunidas em contigs utilizando o programa Phred (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) Phrap (www.phrap.org) e Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). Sequências confirmadas nas direções 3' e 5' foram submetidas ao banco de dados GenBank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para buscar alinhamentos significativos.

Conforme a similaridade entre o respectivo isolado e os gêneros obtidos no banco de dados, alinhamentos múltiplos foram realizados com ClustalX versão 1.83 (THOMPSON et al., 1997) utilizando as sequências obtidas. Para os alinhamentos, também foram incluídas sequências obtidas a partir de genomas de estirpes tipo e referência que apresentaram homologia com as sequências dos isolados obtidos (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Estirpes tipo e referência que apresentaram homologia com as sequências parciais do gene *16S RNAr* dos isolados bacterianos obtidos de milho.

| Espécie | Nº acesso¹ | Estirpe² |
|--|------------------------------|----------------------------|
| <i>Classe Betaproteobacteria</i> | | |
| <i>Burkholderia caribensis</i> DSM 13236 ^T | Y17009 | Tipo |
| <i>Burkholderia cenocepacia</i> DSM 16553 ^T | AF148556 | Tipo |
| <i>Burkholderia cepacia</i> DSM 7288 ^T | AF097530 | Tipo |
| <i>Burkholderia gladioli</i> DSM 4285 ^T | EU024168 | Tipo |
| <i>Burkholderia graminis</i> DSM 17151 ^T | U96939 | Tipo |
| <i>Burkholderia plantarii</i> DSM 9509 ^T | U96933 | Tipo |
| <i>Burkholderia silvatlantica</i> DSM 21840 ^T | AY965240 | Tipo |
| <i>Burkholderia thailandensis</i> DSM 13276 ^T | U91838 | Tipo |
| <i>Burkholderia tropica</i> DSM 15359 ^T | AJ420332 | Tipo |
| <i>Burkholderia unamae</i> DSM 17197 ^T | AY221956 | Tipo |
| <i>Burkholderia vietnamiensis</i> DSM 11319 ^T | AF097534 | Tipo |
| <i>Classe Alphaproteobacteria</i> | | |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | D14500 | Referência |
| <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T | AY945955 | Tipo |
| <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T | EU488752 | Tipo |
| <i>Rhizobium endophyticum</i> ATCC BAA-2116 ^T | EU867317 | Tipo |
| <i>Rhizobium etli</i> DSM 11541 ^T | NR_029184 | Tipo |
| <i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T | AY738130 | Tipo |
| <i>Sphingomonas azotifigens</i> DSM 18530 ^T | AB217471 | Tipo |
| <i>Sphingomonas yabuuchiae</i> DSM 14562 ^T | AB071955 | Tipo |
| <i>Sphingomonas endophytica</i> JCM 17394 ^T | HM629444 | Tipo |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> IFO 13935 ^T | D13725 | Tipo |
| <i>Sphingomonas trueperi</i> DSM 7225 ^T | X97776 | Tipo |
| <i>Classe Gammaproteobacteria</i> | | |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405 ^T | AJ293463 | Tipo |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DSM 50170 ^T | AB294553 | Tipo |
| <i>Stenotrophomonas pavanii</i> LMG 25348 ^T | HQ641452 | Tipo |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> ATCC 35933 ^T | X95921 | Tipo |
| <i>Xanthomonas sacchari</i> DSM 22617 ^T | Y10766 | Tipo |

| Continuação... | | Continua... |
|--|------------------------|-------------|
| Espécie | Nº acesso ¹ | Estirpe |
| <i>Pseudoxanthomonas kalamensis</i> DSM 18571 ^T | AY686710 | Tipo |
| <i>Pseudoxanthomonas spadix</i> DSM 18855 ^T | AM418384 | Tipo |
| <i>Dyella japonica</i> DSM 16301 ^T | AB110498 | Tipo |
| <i>Dyella koreensis</i> DSM 17803 ^T | AY884571 | Tipo |
| <i>Dyella soli</i> JCM 15423 ^T | EU604272 | Tipo |
| <i>Enterobacter asburiae</i> DSM 17506 ^T | AB004744 | Tipo |
| <i>Enterobacter ludwigii</i> CIP 108491 ^T | AJ853891 | Tipo |
| <i>Enterobacter oryzae</i> LMG 24251 ^T | EF488759 | Tipo |
| <i>Enterobacter radicincitans</i> CIP 108468 ^T | AY563134 | Tipo |
| <i>Leclercia adecarboxylata</i> CIP 82.92 ^T | JN175338 | Tipo |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182 ^T | AJ871858 | Tipo |
| <i>Klebsiella planticola</i> ATCC 33531 ^T | AF129443 | Tipo |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM 1662 ^T | AB594768 | Tipo |
| <i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493 ^T | AJ233423 | Tipo |
| <i>Pantoea allii</i> DSM 25133 ^T | AY530795 | Tipo |
| <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JCM 5968 ^T | AB021379 | Tipo |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM 12022 ^T | HE617668 | Tipo |
| Classe <i>Actinobacteridae</i> | | |
| <i>Microbacterium thalassium</i> DSM 12511 ^T | AM181507 | Tipo |
| <i>Microbacterium binotii</i> CIP 101303 ^T | EF567306 | Tipo |
| Classe <i>Bacilli</i> | | |
| <i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 ^T | AB598736 | Tipo |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 ^T | AB255669 | Tipo |

¹ Números de depósito no Banco de Dados do *GenBank*. ² Estirpe tipo da coleção: **DSM**: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; **ATCC**: American Type Culture Collection; **CIAT**: Rhizobium Collection, Centro Internacional de Agricultura Tropical; **JCM**: Japan Collection of Microorganisms; **IFO**: Institute for Fermentation, Culture Collection of Microorganisms; **CIP**: Collection of Institut Pasteur; **LMG**, Culture Collection, Laboratory of Microbiology; **IAM**: Institute of Applied Microbiology Culture Collection.

As árvores filogenéticas foram geradas utilizando a versão MEGA 5 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004) com parâmetros padrão, K2P modelo distância (KIMURA, 1980), e o algoritmo Neighbour-joining (SAITOU; NEI, 1987). O suporte

estatístico para os nós da árvore foi avaliado por análises de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), com 1000 repetições.

Após a caracterização molecular dos isolados, a diversidade dos gêneros nas áreas foi analisada pelo índice de Shannon (H') (MAGURRAN, 1988), utilizando o programa StatSoft (StatSoft, versão 7, 2004).

4.2.4 Produção de Compostos Indólicos In Vitro

Cada isolado foi crescido em 10 mL de meio Dygs líquido na ausência e na presença de 100 µg mL⁻¹ de triptofano e incubados a 100 rpm durante 24 h a 30 °C no escuro. O crescimento bacteriano foi avaliado em espectrofotômetro a 620 nm. A seguir, 2 mL de cada crescimento bacteriano, em triplicata, foram transferidos para microtubos e centrifugados a 10.000 g durante 10 min, em seguida, 1,5 mL do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio, juntamente com 1 mL do reagente de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995). Após 30 min no escuro em temperatura ambiente, a intensidade da cor foi medida em 540 nm. Os resultados foram expressos como µg AIA mL⁻¹ com base em uma curva de calibração utilizando AIA sintético.

4.2.5 Capacidade de FBN In Vitro

A avaliação da FBN *in vitro* foi realizada com base no enriquecimento em N do respectivo meio de cultura semi-sólido livre de N a partir do qual os isolados foram obtidos. Após a inoculação, em duplicata, de cada isolado no seu respectivo meio, juntamente com um controle contendo meio de cultura sem inoculação, esses foram incubados a 30 °C por sete dias (BENEDUZI et al., 2008). Em seguida, os meios que continham 5 mL de cultura antes da incubação foram homogeneizados e alíquotas de 3 mL foram levadas para a digestão sulfúrica seguido de destilação Semi Micro Kjeldahl para a obtenção do teor de N total contido no meio cultura (BREMNER; MULVANEY, 1982).

4.2.6 Solubilização de Fosfato

Cada isolado foi transferido para o meio de cultura para a avaliação da solubilização de fosfato [0,1 g de KNO₃; 10,0 g de glicose; 5,0 g de extrato de levedura; 0,2 g MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de NaCl; 0,02 g de CaCl₂, 2 mL de solução de micronutrientes (idem ao JNFb); 4 mL FeEDTA (solução 1,64%); 4,93 g CaHPO₄] (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) e incubados durante seis dias a 30 °C no escuro, em triplicata. A capacidade de solubilização foi considerada positiva quando um halo claro ao redor da colônia foi observado, e então medido a partir da borda da colônia com o auxílio de um paquímetro.

4.2.7 Produção de Sideróforos

Para a avaliação da produção de sideróforos, os isolados foram cultivados em meio Dygs solidificado contendo cromoazurol S (chromoazurol S 60,5 mg L⁻¹, hexadeciltrimetilamônio 72,9 mg L⁻¹ e cloreto de ferro 1 mM em HCl 10 mM) (SCHWYN; NEILANDS, 1987), em triplicata. O halo em volta da colônia foi medido da mesma forma como indicada anteriormente, após três dias de incubação a 30 °C no escuro.

4.2.8 Avaliação do Crescimento Inicial de Plântulas de Milho na Presença dos Isolados

Alguns isolados foram selecionados pelo seguinte critério: um isolado de cada espécie encontrada na caracterização molecular, em conjunto com os resultados obtidos *in vitro* quanto à promoção de substâncias envolvidas no crescimento vegetal. As plântulas com três dias de germinação foram cultivadas hidroponicamente em 200 mL de solução nutritiva estéril sem adição de N (idem ao meio JNFb, porém sem adição de azul de bromotimol e de ágar, pH 7,0), em sacos plásticos esterelizados. Em seguida, 1 mL da suspensão da bactéria em solução salina 0,85% na DO 0,5 a 540 nm de cada isolado selecionado (concentração 10⁸ células de bactérias por mL) foi inoculado nos sacos contendo as plântulas, em seis repetições. Controles negativos sem adição de bactérias e positivos utilizando as estirpes de referência *A. brasilense* AbV5 e AbV6 também foram incluídos. Após 10

dias em casa de vegetação foi avaliada a massa total da planta, massa da parte aérea, massa da raiz e o comprimento, área e volume da raiz com ajuda do programa Safira 1.1 (JORGE; RODRIGUES, 2008). As avaliações foram feitas com base na diferença relativa que cada isolado promoveu em relação à testemunha não inoculada, para as diferentes variáveis avaliadas.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análises das Sequências de 16S RNAr

Os isolados obtidos encontram-se depositados na Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras de Crescimento de Plantas da Embrapa-Soja (Londrina-PR-Brasil). A identificação na coleção, assim como o respectivo número de acesso das sequências do gene *16S RNAr* depositadas no *GenBank* estão apresentados na Tabela 4.3.

Foram obtidos 86 isolados, sendo 37 obtidos do meio JNFb, 26 do meio JMV e 23 do meio LGI. Os gêneros *Burkholderia*, *Agrobacterium* e *Stenotrophomonas* estiveram presentes nas amostras de plantas de todas as áreas avaliadas (Tabela 4.3). As áreas não diferiram quanto ao número de gêneros obtidos (entre 7 e 8 cada), porém diferiram qualitativamente quanto aos diferentes gêneros encontrados. Por exemplo, somente nas plantas da área PDC1 estavam presentes os quatro isolados do gênero *Microbacterium*, enquanto os dois isolados de *Bacillus* foram isolados apenas das amostras da área PCC2. Na área PDC2 observou-se o maior número de isolados de *Burkholderia* e *Agrobacterium* (9 e 5, respectivamente). Já na área PDA, foram obtidos sete isolados de *Burkholderia* e três dos cinco de *Pseudoxanthomonas*.

Tabela 4.3 – Identificação por similaridade pela comparação das sequências parciais do gene *16S RNAr* de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de milho com as sequências depositadas no banco de dados *GenBank*.

| Nº coleção Embrapa ¹ | Área | Meio isolado | Gênero | pb ² | % ³ | Nº acesso |
|---------------------------------|------|--------------|-------------------------|-----------------|----------------|-----------|
| 2312 | PDC1 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1361 | 98 | JX174189 |
| 2313 | PDC1 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1480 | 99 | JX174190 |
| 2314 | PDC1 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1433 | 100 | JX174191 |
| 2315 | PDC1 | JNFb | <i>Microbacterium</i> | 1393 | 99 | JX174192 |
| 2316 | PDC1 | JNFb | <i>Microbacterium</i> | 1492 | 99 | JX174193 |
| 2317 | PDC1 | JNFb | <i>Microbacterium</i> | 1492 | 99 | JX174194 |
| 2318 | PDC1 | JNFb | <i>Microbacterium</i> | 1415 | 99 | JX174195 |
| 2319 | PDC1 | JNFb | <i>Pseudomonas</i> | 1478 | 99 | JX174196 |
| 2320 | PDC1 | JMV | <i>Rhizobium</i> | 1443 | 99 | JX174197 |
| 2321 | PDC1 | JMV | <i>Rhizobium</i> | 1466 | 98 | JX174198 |
| 2322 | PDC1 | JMV | <i>Rhizobium</i> | 1457 | 99 | JX174199 |
| 2323 | PDC1 | JNFb | <i>Sphingomonas</i> | 1353 | 99 | JX174200 |
| 2324 | PDC1 | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1537 | 99 | JX174201 |
| 2325 | PDC1 | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1459 | 99 | JX174202 |
| 2326 | PDC1 | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1536 | 99 | JX174203 |
| 2327 | PDC2 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1373 | 99 | JX174204 |
| 2328 | PDC2 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1395 | 99 | JX174205 |
| 2329 | PDC2 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1377 | 99 | JX174206 |
| 2330 | PDC2 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1472 | 98 | JX174207 |
| 2331 | PDC2 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1372 | 99 | JX174208 |
| 2332 | PDC2 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1486 | 99 | JX174209 |
| 2333 | PDC2 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1526 | 99 | JX174210 |
| 2334 | PDC2 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1477 | 99 | JX174211 |
| 2335 | PDC2 | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1528 | 99 | JX174212 |
| 2336 | PDC2 | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1528 | 99 | JX174213 |
| 2337 | PDC2 | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1452 | 99 | JX174214 |
| 2338 | PDC2 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1533 | 99 | JX174215 |
| 2339 | PDC2 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1470 | 100 | JX174216 |
| 2340 | PDC2 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1512 | 98 | JX174217 |
| 2341 | PDC2 | LGI | <i>Dyella japonica</i> | 1485 | 99 | JX174218 |
| 2342 | PDC2 | LGI | <i>Enterobacter</i> | 1425 | 99 | JX174219 |
| 2343 | PDC2 | LGI | <i>Leclercia</i> | 1480 | 99 | JX174220 |
| 2344 | PDC2 | JNFb | <i>Pantoea</i> | 1443 | 99 | JX174221 |
| 2345 | PDC2 | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1385 | 97 | JX174222 |
| 2346 | PDA | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1339 | 99 | JX174223 |
| 2347 | PDA | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1404 | 99 | JX174224 |
| 2348 | PDA | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1538 | 99 | JX174225 |
| 2349 | PDA | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1449 | 99 | JX174226 |
| 2350 | PDA | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1316 | 99 | JX174227 |
| 2351 | PDA | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1557 | 96 | JX174228 |

Continua...

Continuação...

| Nº coleção CNPSO¹ | Área | Meio isolado | Gênero | pb² | %³ | Nº acesso |
|---|-------------|---------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| 2352 | PDA | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1525 | 100 | JX174229 |
| 2353 | PDA | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1373 | 99 | JX174230 |
| 2354 | PDA | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1389 | 99 | JX174231 |
| 2355 | PDA | LGI | <i>Enterobacter</i> | 1442 | 99 | JX174232 |
| 2356 | PDA | LGI | <i>Enterobacter</i> | 1440 | 99 | JX174233 |
| 2357 | PDA | JNFb | <i>Enterobacter</i> | 1413 | 99 | JX174234 |
| 2358 | PDA | JNFb | <i>Enterobacter</i> | 1390 | 99 | JX174235 |
| 2359 | PDA | LGI | <i>Klebsiella</i> | 1445 | 99 | JX174236 |
| 2360 | PDA | JMV | <i>Pseudoxanthomonas</i> | 1458 | 99 | JX174237 |
| 2361 | PDA | LGI | <i>Pseudoxanthomonas</i> | 1445 | 99 | JX174238 |
| 2362 | PDA | JNFb | <i>Pseudoxanthomonas</i> | 1335 | 99 | JX174239 |
| 2363 | PDA | JNFb | <i>Sphingomonas</i> | 1483 | 98 | JX174240 |
| 2364 | PDA | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1446 | 99 | JX174241 |
| 2365 | PDA | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1535 | 99 | JX174242 |
| 2366 | PDA | JMV | <i>Xanthomonas</i> | 1398 | 99 | JX174243 |
| 2367 | PCC1 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1479 | 99 | JX174244 |
| 2368 | PCC1 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1386 | 98 | JX174245 |
| 2369 | PCC1 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1495 | 99 | JX174246 |
| 2370 | PCC1 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1473 | 99 | JX174247 |
| 2371 | PCC1 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1514 | 99 | JX174248 |
| 2372 | PCC1 | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1491 | 99 | JX174249 |
| 2373 | PCC1 | LGI | <i>Enterobacter</i> | 1487 | 99 | JX174250 |
| 2374 | PCC1 | JMV | <i>Enterobacter</i> | 1487 | 99 | JX174251 |
| 2375 | PCC1 | JMV | <i>Enterobacter</i> | 1517 | 99 | JX174252 |
| 2376 | PCC1 | JNFb | <i>Leclercia</i> | 1536 | 99 | JX174253 |
| 2377 | PCC1 | LGI | <i>Pseudoxanthomonas</i> | 1475 | 99 | JX174254 |
| 2378 | PCC1 | LGI | <i>Sphingomonas</i> | 1489 | 98 | JX174255 |
| 2379 | PCC1 | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1504 | 97 | JX174256 |
| 2380 | PCC1 | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1345 | 98 | JX174257 |
| 2381 | PCC1 | JMV | <i>Xanthomonas</i> | 1395 | 99 | JX174258 |
| 2382 | PCC2 | JNFb | <i>Agrobacterium</i> | 1479 | 99 | JX174259 |
| 2383 | PCC2 | JMV | <i>Bacillus</i> | 1368 | 99 | JX174260 |
| 2384 | PCC2 | JMV | <i>Bacillus</i> | 1562 | 98 | JX174261 |
| 2385 | PCC2 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1544 | 98 | JX174262 |
| 2386 | PCC2 | JMV | <i>Burkholderia</i> | 1541 | 99 | JX174263 |
| 2387 | PCC2 | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1519 | 99 | JX174264 |
| 2388 | PCC2 | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1531 | 98 | JX174265 |
| 2389 | PCC2 | LGI | <i>Burkholderia</i> | 1538 | 99 | JX174266 |
| 2390 | PCC2 | JNFb | <i>Enterobacter</i> | 1389 | 99 | JX174267 |
| 2391 | PCC2 | JNFb | <i>Enterobacter</i> | 1509 | 99 | JX174268 |
| 2392 | PCC2 | JNFb | <i>Klebsiella</i> | 1531 | 99 | JX174269 |

| | | | | | | |
|------|------|------|--------------------------|------|----|----------|
| 2393 | PCC2 | JNFb | <i>Pseudoxanthomonas</i> | 1355 | 99 | JX174270 |
|------|------|------|--------------------------|------|----|----------|

Continua...

Continuação...

| Nº coleção CNPSO ¹ | Área | Meio isolado | Gênero | pb ² | % ³ | Nº acesso |
|----------------------------------|------|--------------|-------------------------|-----------------|----------------|-----------|
| 2394 | PCC2 | JMV | <i>Rhizobium</i> | 1476 | 99 | JX174271 |
| 2395 | PCC2 | LGI | <i>Rhizobium</i> | 1461 | 99 | JX174272 |
| 2396 | PCC2 | LGI | <i>Rhizobium</i> | 1488 | 99 | JX174273 |
| 2397 | PCC2 | JNFb | <i>Stenotrophomonas</i> | 1371 | 98 | JX174274 |

Áreas: PDC1- Plantio direto, sistema de cultivo convencional; PDC2- Plantio direto, sistema de cultivo convencional; PDA- Plantio direto, sistema de cultivo agroecológico; PCC1- Plantio convencional, sistema de cultivo convencional com queima; PCC2- Plantio convencional, sistema de cultivo convencional sem queima. ¹ Embrapa Soja - Centro Nacional de Pesquisa de Soja; ² pb- número de pares de base obtidos no sequenciamento; ³ %- porcentagem de similaridade com sequências de gêneros depositadas no *GenBank*.

4.3.2 Caracterização Fenotípica das Colônias

Quanto à caracterização fenotípica, os isolados apresentaram diferenças morfológicas das colônias entre os diferentes gêneros e também entre os isolados do mesmo gênero. O primeiro dendrograma, com isolados obtidos a partir do meio JNFb (Figura 4.1) separou as bactérias em dois grandes grupos. O dendrograma formado com isolados obtidos do meio JMV (Figura 4.2) mostra a formação de quatro grupos de similaridade. O último dendrograma, com os isolados do meio LGI (Figura 4.3), formou três grupos isolados bacterianos com base nas características morfológicas das colônias.

Figura 4.1 – Dendrograma de similaridade com base nas características morfológicas das colônias de isolados crescidos no meio JNFb, calculado pelo algoritmo UPGMA. Cor da borda: creme (*azul*); translúcida (*verde*); branco (*vermelho*). Cor do centro: creme (*azul*); branco (*verde*); amarelo (*vermelho*). Elevação: plana (*azul*); côncava (*verde*); convexa (*vermelho*). Borda: ondulada (*azul*); dentada (*verde*); inteira (*vermelho*). Detalhe óptico: brilhosa (*azul*); opaca (*verde*). Modificação do pH: alcalino (*azul*); ácido (*verde*); neutro (*vermelho*).

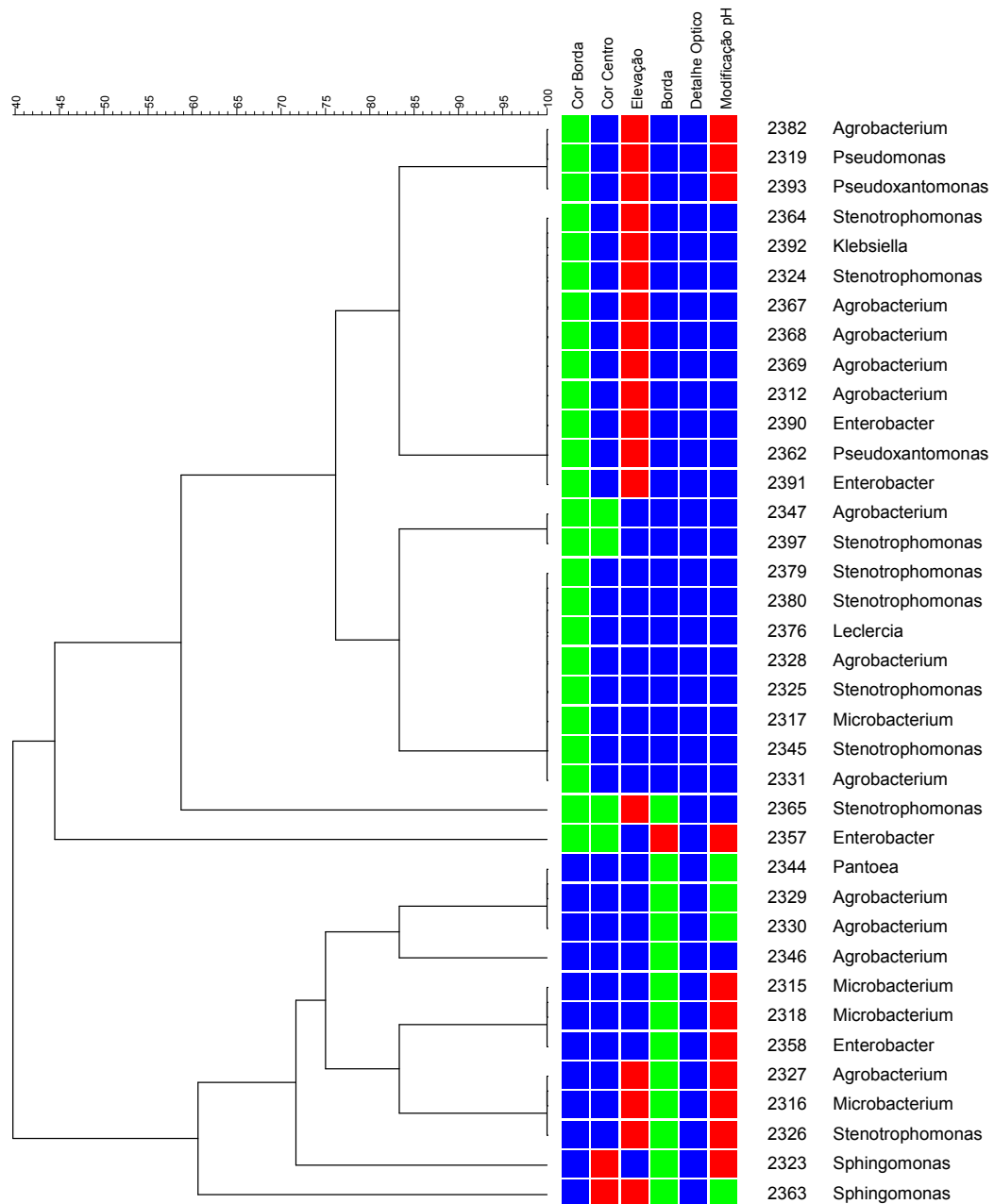


Figura 4.2 – Dendrograma de similaridade com base nas características morfológicas das colônias de isolados crescidos no meio JMV, calculado pelo algoritmo UPGMA. Cor da borda: creme (*azul*); translúcida (*verde*); branco (*vermelho*). Cor do centro: creme (*azul*); branco (*verde*); amarelo (*vermelho*). Elevação: plana (*azul*); côncava (*verde*); convexa (*vermelho*). Borda: ondulada (*azul*); dentada (*verde*); inteira (*vermelho*). Detalhe óptico: brilhosa (*azul*); opaca (*verde*). Modificação do pH: alcalino (*azul*); ácido (*verde*); neutro (*vermelho*).

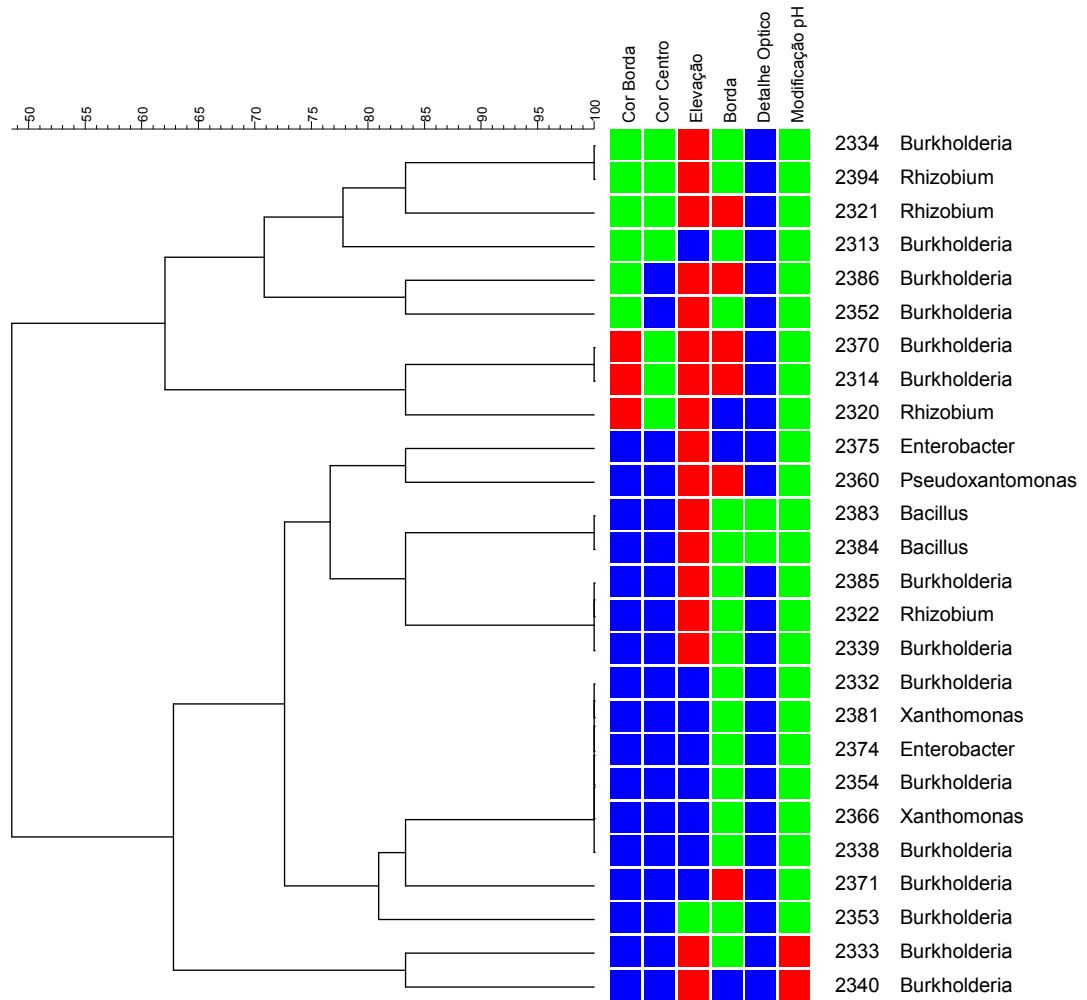
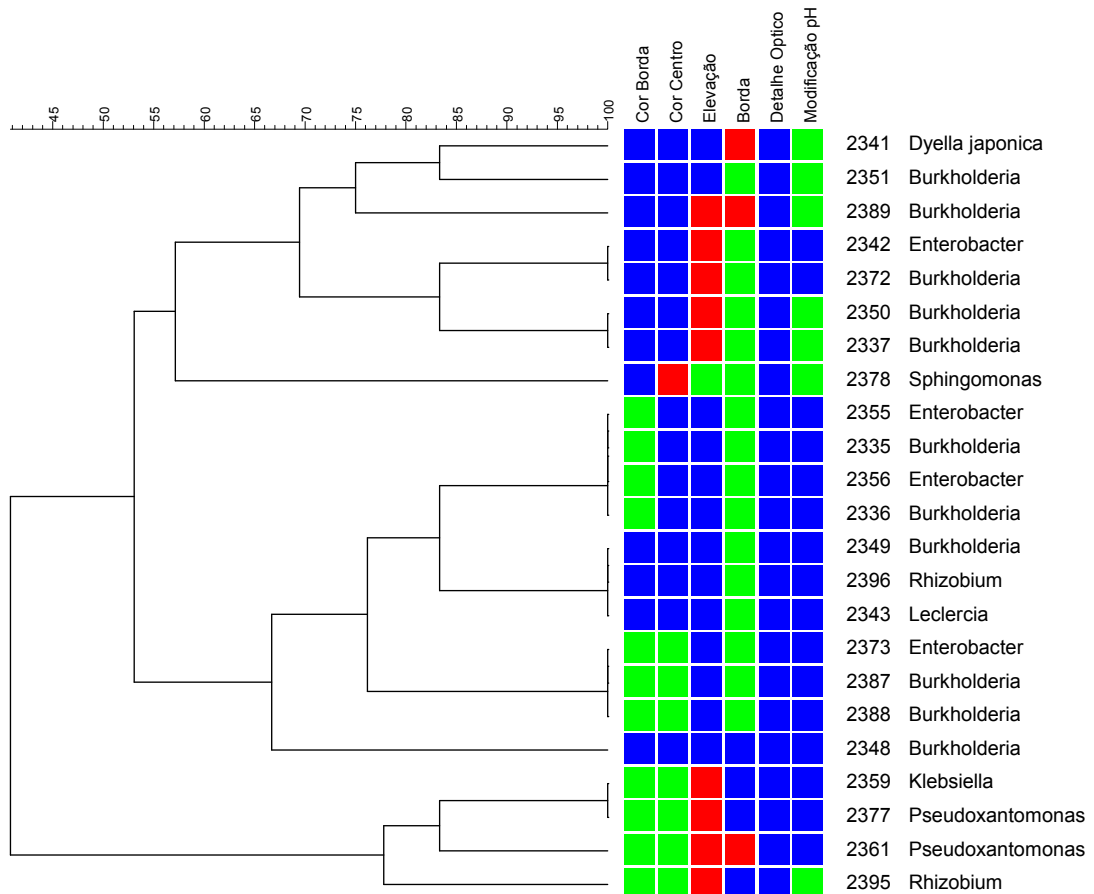


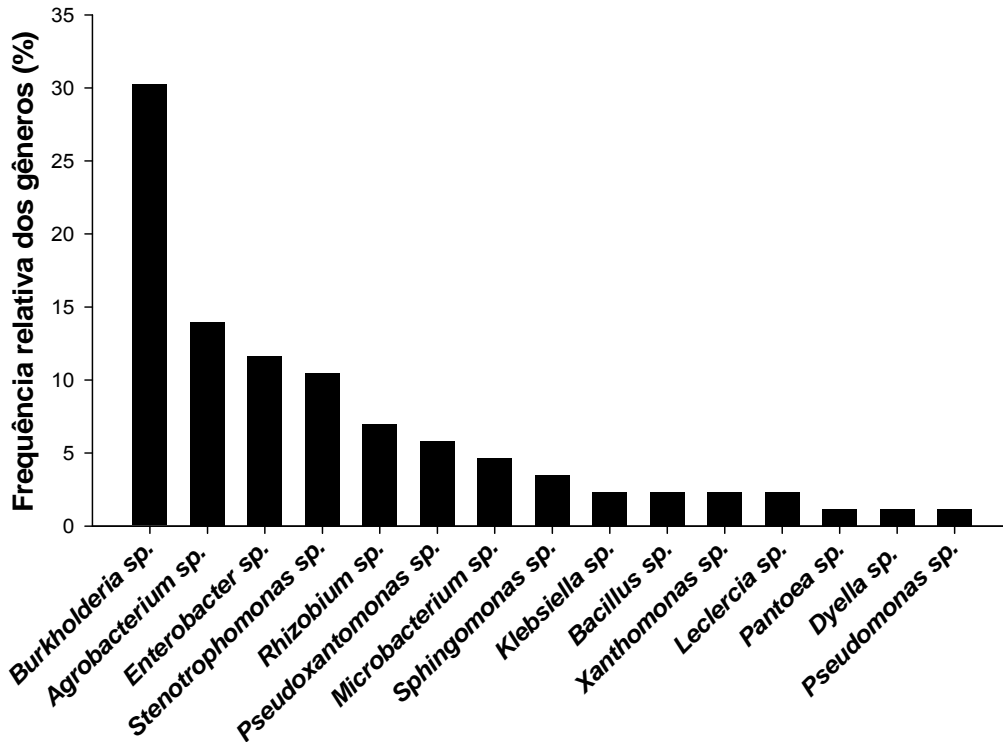
Figura 4.3 – Dendrograma de similaridade com base nas características morfológicas das colônias de isolados crescidos no meio LGI, calculado pelo algoritmo UPGMA. Cor da borda: creme (*azul*); translúcida (*verde*); branco (*vermelho*). Cor do centro: creme (*azul*); branco (*verde*); amarelo (*vermelho*). Elevação: plana (*azul*); côncava (*verde*); convexa (*vermelho*). Borda: ondulada (*azul*); dentada (*verde*); inteira (*vermelho*). Detalhe óptico: brilhosa (*azul*); opaca (*verde*). Modificação do pH: alcalino (*azul*); ácido (*verde*); neutro (*vermelho*).



4.3.3 Ocorrência e Similaridade dos Isolados

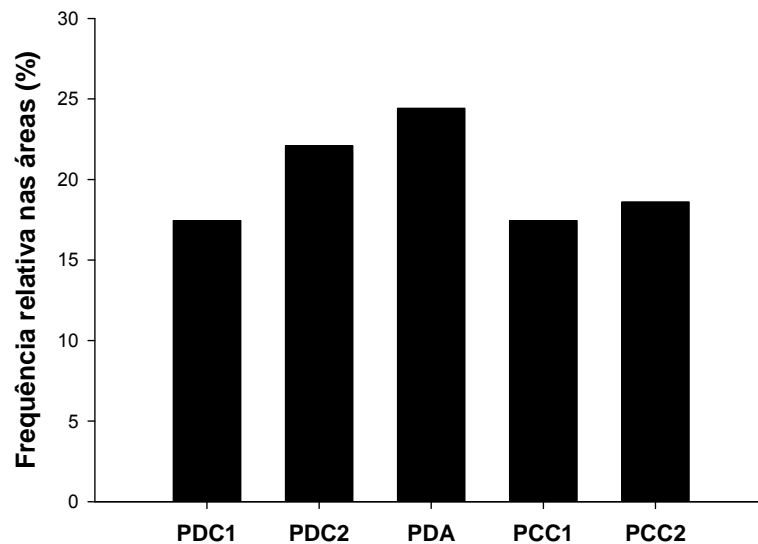
A maior ocorrência dos isolados foi do gênero *Burkholderia* (30% de 86 isolados), seguido de *Agrobacterium* (14%) e a menor ocorrência foi dos gêneros *Pantoea*, *Dyella* e *Pseudomonas* (1 isolado cada) de acordo com as similaridades encontradas no *GenBank* (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Frequência relativa dos gêneros de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de plantas de milho cultivadas em sistema de produção agroecológico e convencional.



Quando foi avaliado o índice de diversidade de Shannon, não houve diferença entre os diferentes sistemas de produção. Porém nota-se que a maior ocorrência dos isolados foi observada na área sob sistema de cultivo agroecológico (PDA) com 24% de 86 isolados, seguido pela área sob sistema de cultivo convencional (PDC2) com 22% de ocorrência, plantio direto em sistema de cultivo convencional com e sem queima (PCC1 e PCC2), com 17% e 19% respectivamente e a área sob plantio direto e sistema de cultivo convencional (PDC1) também com 17% de isolados (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Frequência relativa de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de plantas de milho em cada área de amostragem. Áreas PDC1: Plantio direto em sistema de cultivo convencional; PDC2: Plantio direto em sistema de cultivo convencional; PDA: Plantio direto em sistema de cultivo agroecológico; PCC1: Plantio convencional com queima; PCC2: Plantio convencional sem queima.



Foram construídas cinco árvores filogenéticas com base nas sequências do gene *16S RNAr* e na maior similaridade entre os isolados e as sequências das estirpes tipo depositadas no banco de dados de genes ribossomais. A árvore filogenética da classe *Betaproteobacteria* contém os 26 isolados do gênero *Burkholderia* spp. (Figura 4.6). Na árvore da classe *Alphaproteobacteria*, os isolados mais similares a *Agrobacterium* sp. (12), *Rhizobium* sp. (6) e *Sphingomonas* sp. (3) foram agrupados juntamente com as estirpes tipo de cada gênero (Figura 4.7). Para os isolados da classe *Gammaproteobacteria* foram obtidas duas árvores filogenéticas, uma formada pelos isolados do gênero *Stenotrophomonas* sp. (9), *Pseudoxanthomonas* sp. (6), *Xanthomonas* sp. (1) e *Dyella* sp. (1) (Figura 4.8), e a outra formada pelos gêneros *Enterobacter* sp., *Leclercia* sp., *Pantoea* sp. (13 no total), *Klebsiella* sp. (2) e *Pseudomonas* sp. (1), cada qual com as respectivas estirpes tipo (Figura 4.9). Finalmente, os isolados dos gêneros *Microbacterium* sp. (4) e *Bacillus* sp. (2) formaram a última árvore filogenética (classe *Actinobacteridae* e *Bacilli*, respectivamente), juntamente com as respectivas estirpes tipo (Figura 4.10). Apenas essa última árvore é formada por bactérias Gram-positivas enquanto todas as demais são formadas por gêneros de bactérias Gram-negativas.

Figura 4.6 – Árvore filogenética da classe β -proteobacteria mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Burkholderia*, obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene 16S RNAr de estirpes tipo depositadas no *GenBank*. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de *bootstrap*.

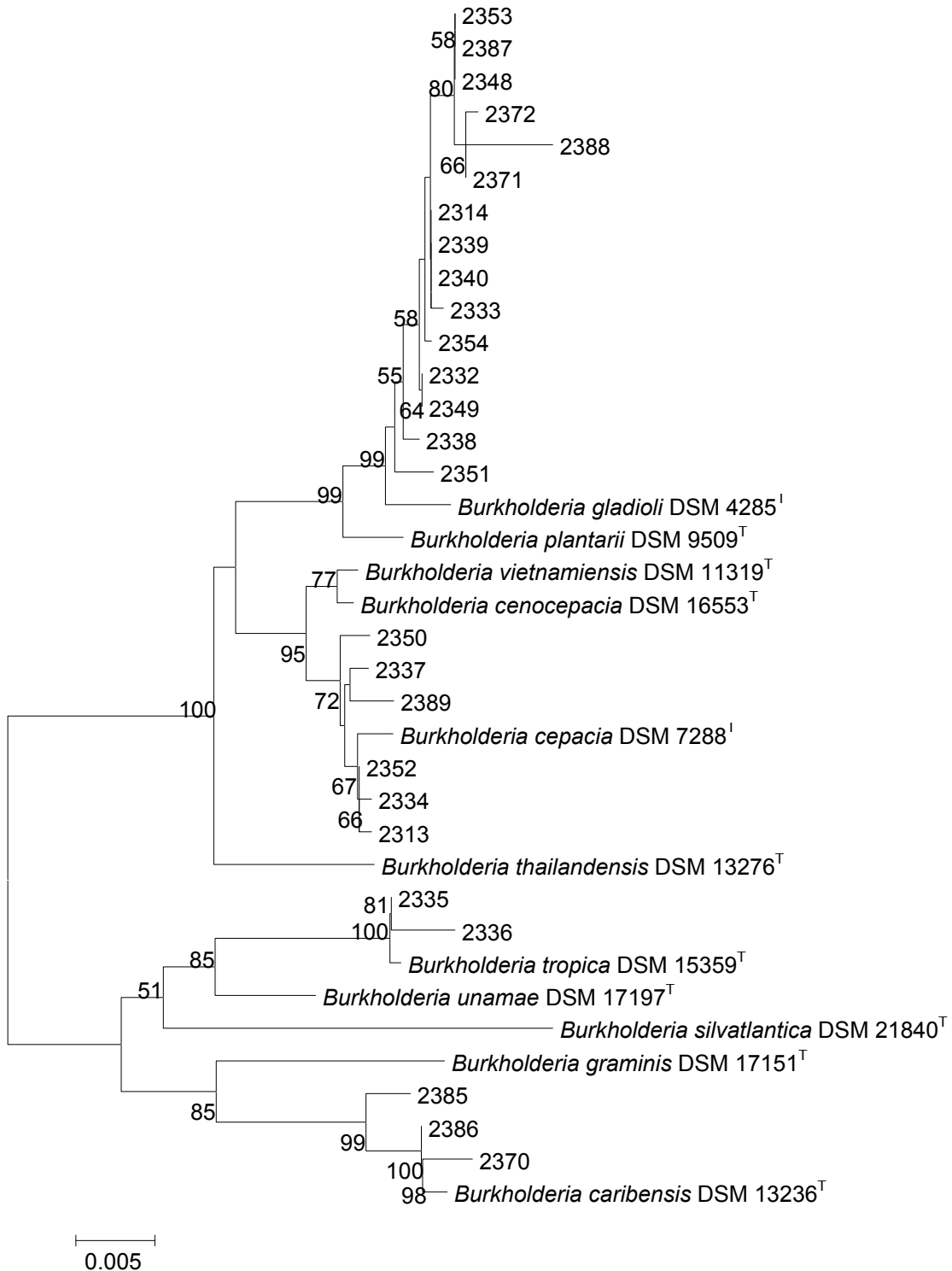


Figura 4.7 – Árvore filogenética da classe α -proteobacteria mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Sphingomonas*, obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene *16S RNAr* de estirpes tipo depositadas no *GenBank*. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de *bootstrap*.

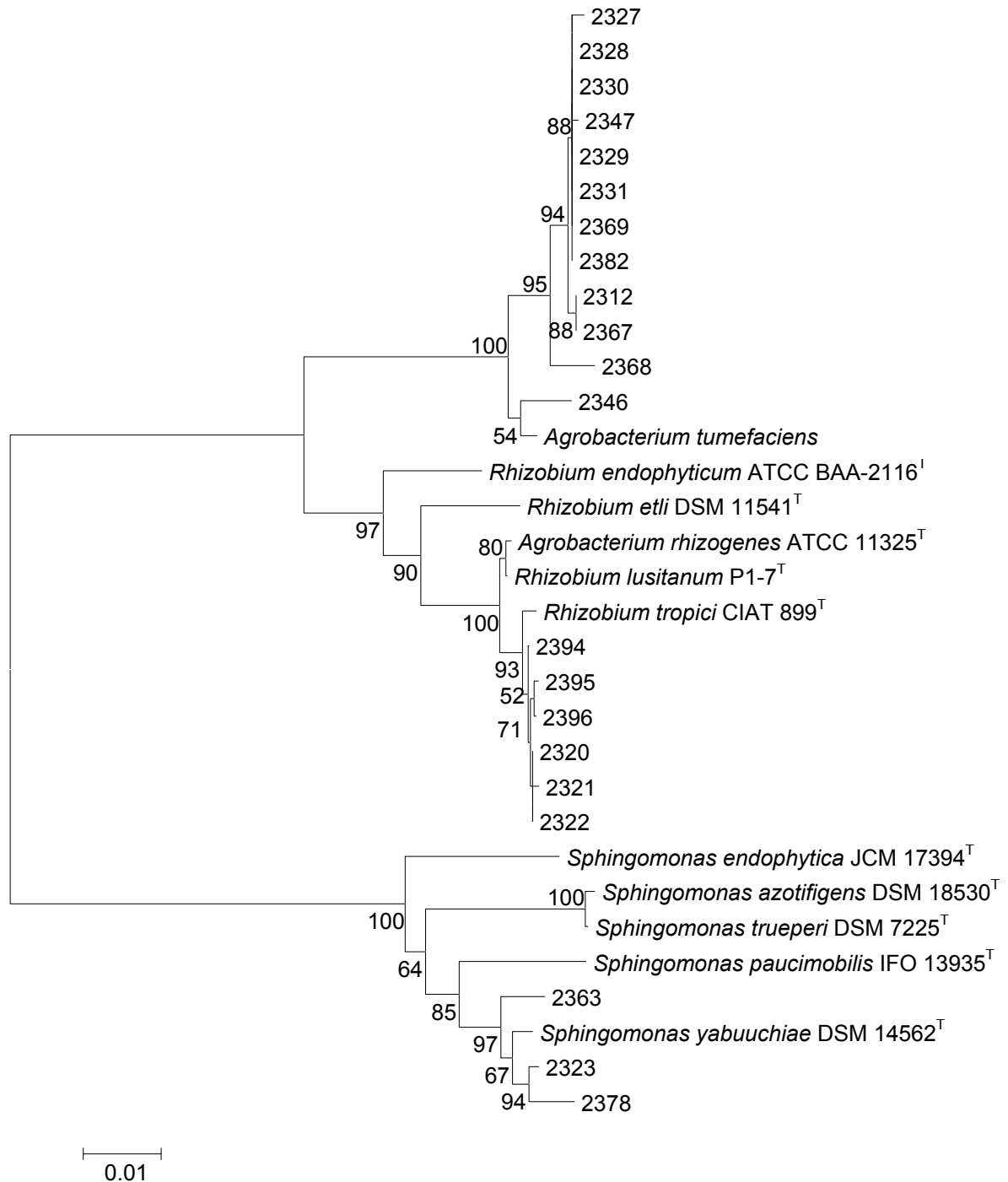


Figura 4.8 – Árvore filogenética da classe γ -*proteobacteria* mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas* e *Dyella*, obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene *16S RNAr* de estirpes tipo depositadas no *GenBank*. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de *bootstrap*.

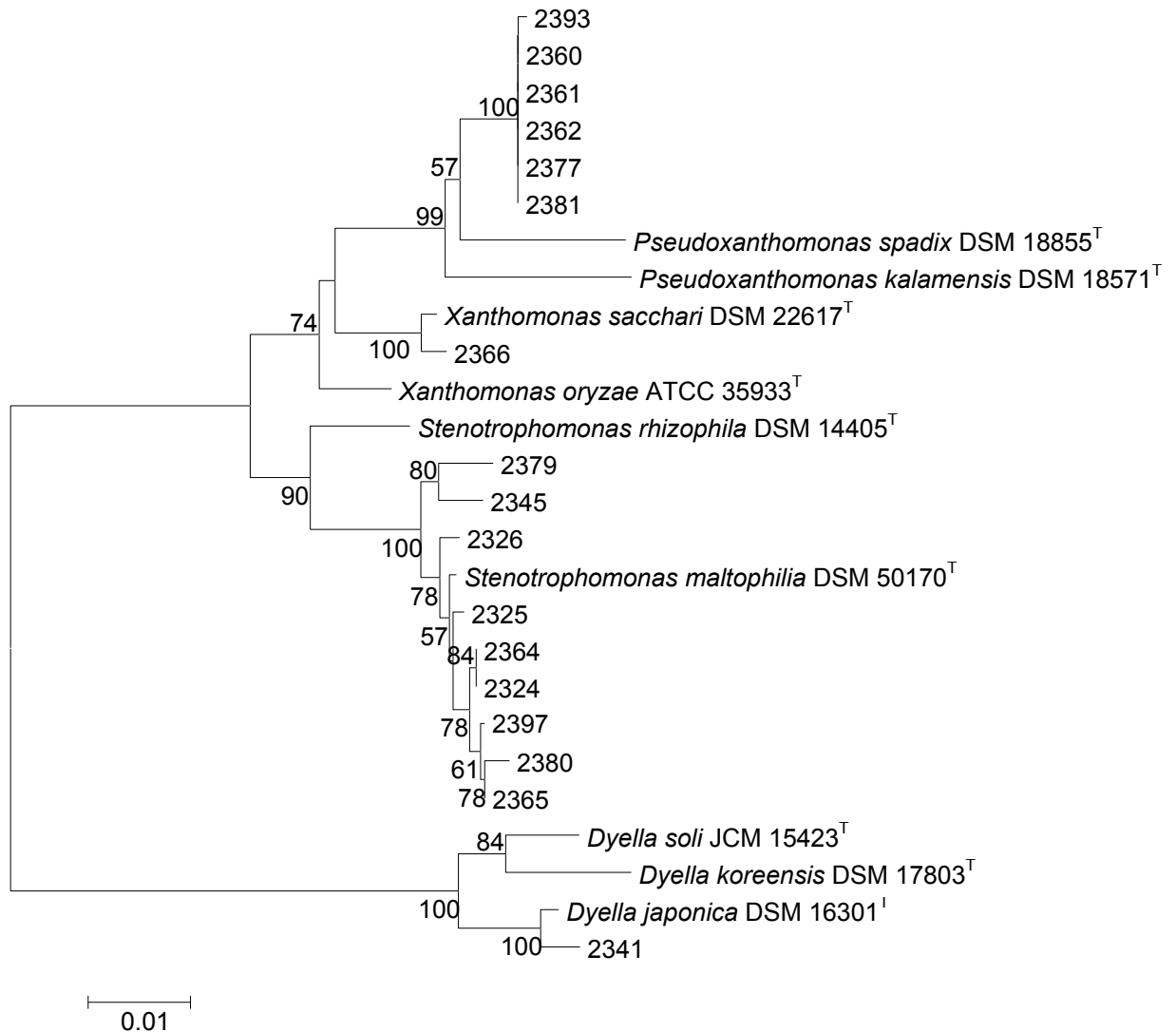


Figura 4.9 – Árvore filogenética da classe γ -*proteobacteria* mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Enterobacter*, *Leclercia*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Pseudomonas*, obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene *16S RNAr* de estirpes tipo depositadas no *GenBank*. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de *bootstrap*.

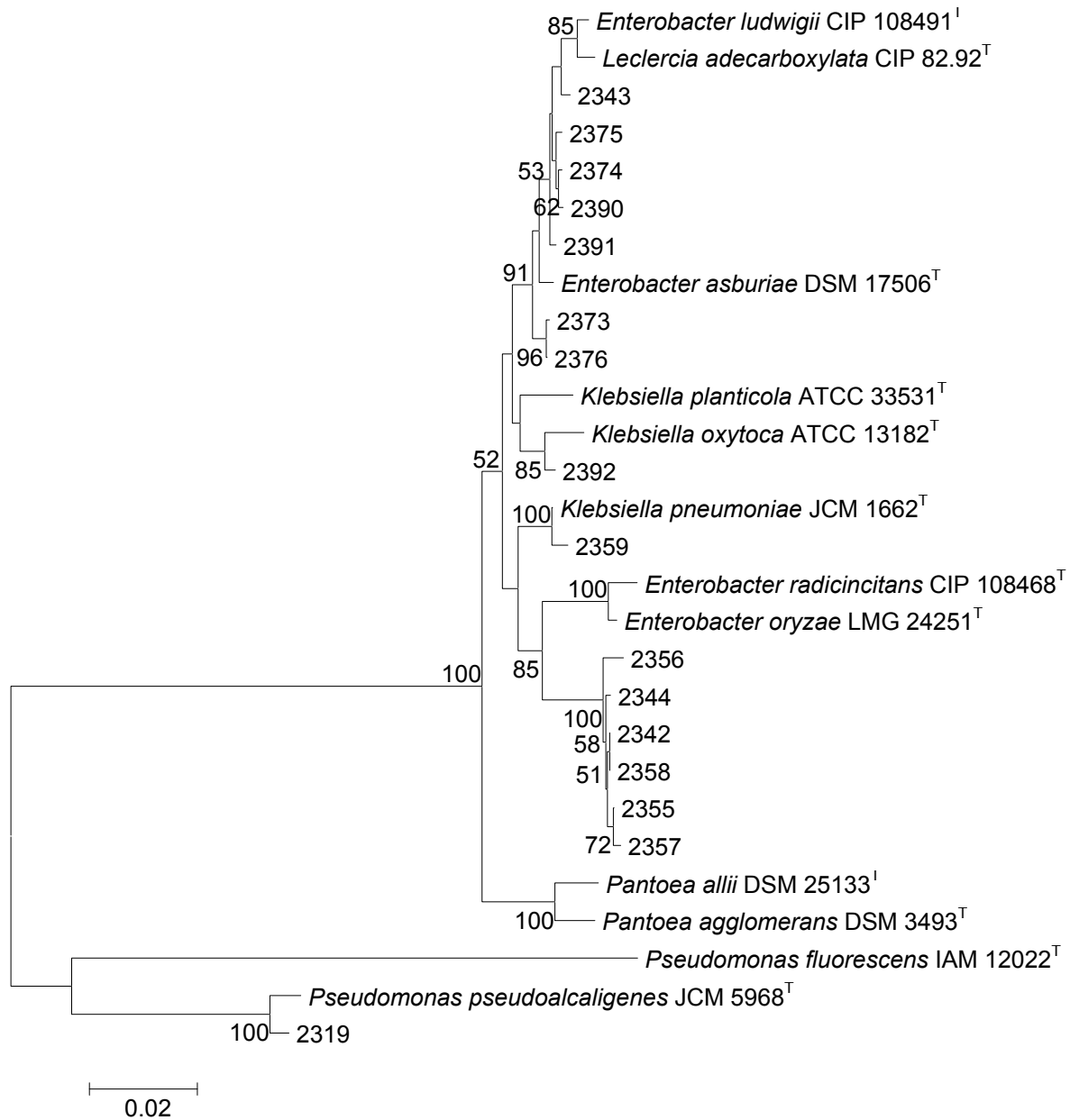
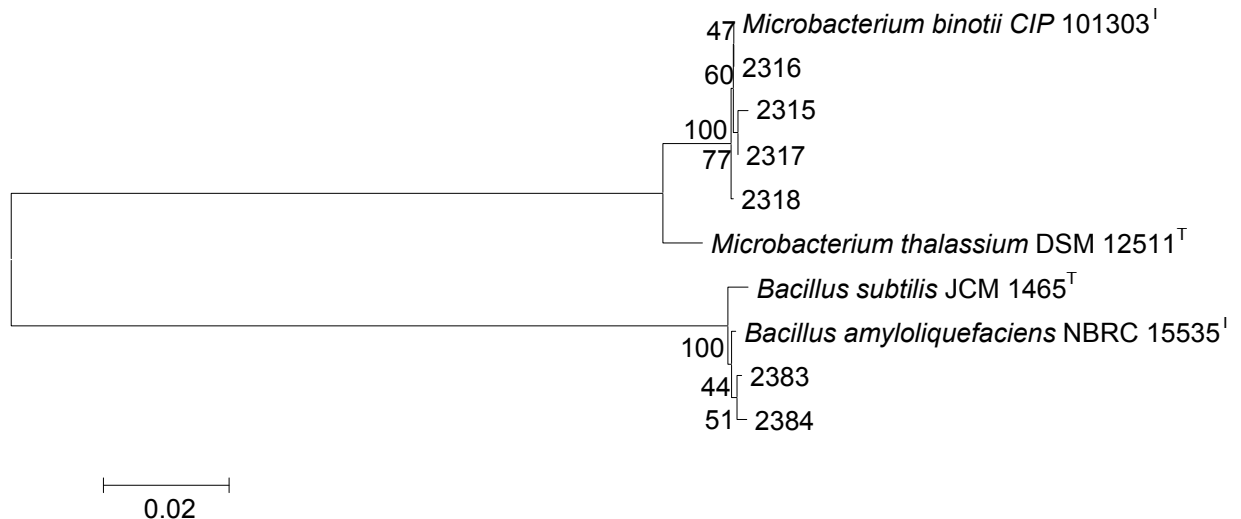


Figura 4.10 – Árvore filogenética das classes *Actinobacteridae* e *Bacilli* mostrando as relações entre isolados de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Microbacterium* e *Bacillus*, obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências do gene *16S RNAr* de estirpes tipo depositadas no *GenBank*. A árvore foi construída utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleótidos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1000 replicações de *bootstrap*.



4.3.4 Produção de Compostos Indólicos e Capacidade de FBN In Vitro

A produção de compostos indólicos foi amplamente distribuída entre os isolados (Tabela 4.4), com maior produção na presença de triptofano, chegando a 26,95 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$ produzidos pelo isolado 2391 (*Enterobacter* sp.) e três isolados com a menor concentração (0,09 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) 2316, 2317 (ambos *Microbacterium* sp.) e 2325 (*Stenotrophomonas* sp.). Além disso, todos os isolados aumentaram a concentração de N no meio de cultura semi-sólido sem N, especialmente o isolado 2364 (*Stenotrophomonas* sp.) chegando a 37,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o isolado 2376 (*Leclercia* sp.) resultou na menor concentração (5,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.3.5 Solubilização de Fosfato e Produção de Sideróforos

A maioria dos isolados do gênero *Burkholderia* sp. foi capaz de solubilizar fosfato (21 isolados), com halos variando de 1,8 a 11,2 mm ao redor da colônia (Tabela 4.4). Por outro lado, a grande maioria produziu sideróforos, com

halos variando de 0,4 a 48,4 mm ao redor das colônias, sendo que o isolado 2313, além de apresentar maior halo de solubilização, também foi o que apresentou maior halo de produção de sideróforos. A formação de halos ao redor das colônias é ilustrada na figura 4.11.

Figura 4.11 – Formação de halo ao redor das colônias, indicando a solubilização de fosfato (A) e a produção de sideróforos (B).

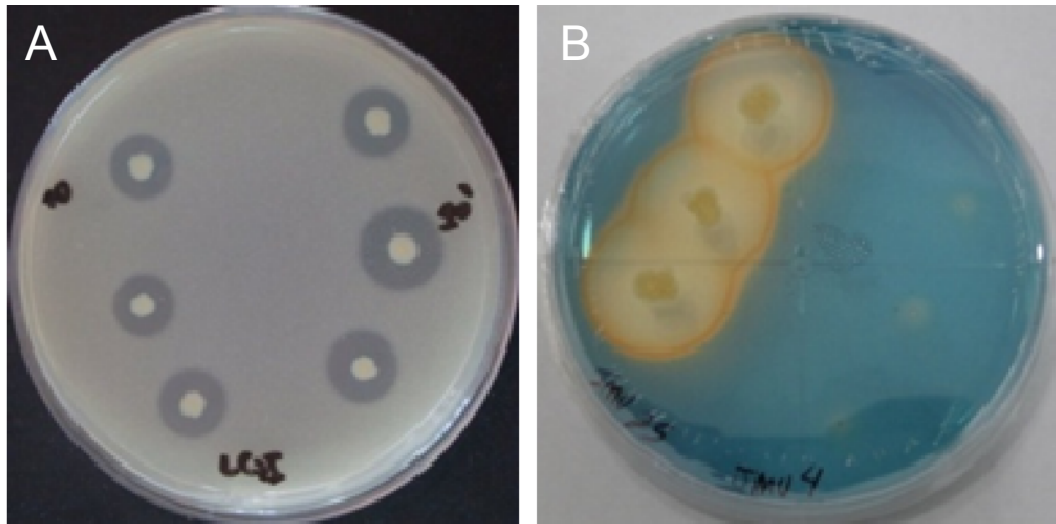


Tabela 4.4 – Caracterização de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas obtidos de milho sob diferentes sistemas de cultivo, quanto à produção de compostos indólicos (estimados em AIA equivalente) com e sem triptofano, teor de N *in vitro*, solubilização de fosfato e produção de sideróforos.

| Nº coleção | AIA ¹ | AIA ² | FBN | Solubilização de fosfato | Sideróforos |
|------------|--------------------------------|------------------|-------|---------------------------------|-------------|
| | -----µg mL ⁻¹ ----- | | | -----Diâmetro do halo (mm)----- | |
| 2312 | 2,94 | 1,16 | 9,80 | 0,00 | 0,00 |
| 2313 | 1,13 | 2,21 | 14,00 | 11,23 | 48,40 |
| 2314 | 1,60 | 2,73 | 14,00 | 4,27 | 22,27 |
| 2315 | 0,25 | 0,35 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2316 | 0,09 | 0,42 | 8,40 | 0,00 | 0,00 |
| 2317 | 0,09 | 0,18 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2318 | 0,46 | 0,32 | 7,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2319 | 1,18 | 0,77 | 11,20 | 0,00 | 0,00 |
| 2320 | 1,32 | 0,07 | 25,20 | 0,00 | 12,40 |
| 2321 | 3,82 | 0,49 | 15,40 | 0,00 | 14,00 |
| 2322 | 2,61 | 0,60 | 15,40 | 0,00 | 0,00 |
| 2323 | 3,03 | 1,02 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2324 | 1,46 | 0,39 | 12,60 | 0,00 | 4,27 |
| 2325 | 0,09 | 0,11 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2326 | 15,49 | 6,44 | 7,00 | 0,00 | 0,00 |

Continua...

Continuação...

| Nº coleção | AIA ¹ | AIA ² | FBN | Solubilização de fosfato | Sideróforos |
|------------|--------------------------------|------------------|-------|---------------------------------|-------------|
| | -----µg mL ⁻¹ ----- | | | -----Diâmetro do halo (mm)----- | |
| 2327 | 7,44 | 0,60 | 7,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2328 | 3,43 | 0,70 | 9,80 | 0,00 | 4,20 |
| 2329 | 1,73 | 0,91 | 7,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2330 | 3,16 | 1,93 | 12,60 | 0,00 | 42,27 |
| 2331 | 5,51 | 0,46 | 8,40 | 0,00 | 5,47 |
| 2332 | 3,09 | 0,91 | 29,40 | 5,30 | 3,20 |
| 2333 | 0,82 | 0,46 | 16,80 | 4,28 | 1,67 |
| 2334 | 15,67 | 1,23 | 16,80 | 0,00 | 0,00 |
| 2335 | 0,78 | 1,19 | 9,80 | 8,97 | 17,93 |
| 2336 | 0,88 | 0,95 | 11,20 | 6,30 | 25,67 |
| 2337 | 1,26 | 2,31 | 15,40 | 9,03 | 28,67 |
| 2338 | 0,50 | 0,21 | 16,80 | 9,33 | 29,27 |
| 2339 | 1,72 | 2,49 | 15,40 | 8,90 | 0,00 |
| 2340 | 1,44 | 1,05 | 30,80 | 1,80 | 27,00 |
| 2341 | 1,54 | 0,74 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2342 | 1,12 | 1,40 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2343 | 20,37 | 3,05 | 9,80 | 0,00 | 8,20 |
| 2344 | 5,30 | 0,39 | 12,60 | 0,00 | 2,80 |
| 2345 | 4,25 | 0,32 | 8,40 | 0,00 | 10,27 |
| 2346 | 6,53 | 1,33 | 12,60 | 0,00 | 1,00 |
| 2347 | 1,62 | 0,53 | 7,00 | 0,00 | 4,27 |
| 2348 | 1,09 | 0,39 | 14,00 | 6,90 | 0,40 |
| 2349 | 3,57 | 2,00 | 15,40 | 4,50 | 0,73 |
| 2350 | 1,27 | 1,23 | 11,20 | 5,77 | 44,00 |
| 2351 | 0,67 | 0,25 | 11,20 | 7,43 | 12,00 |
| 2352 | 1,02 | 0,11 | 16,80 | 0,00 | 43,47 |
| 2353 | 3,20 | 3,61 | 12,60 | 7,80 | 27,00 |
| 2354 | 0,34 | 0,07 | 15,40 | 7,80 | 16,73 |
| 2355 | 1,34 | 0,56 | 15,40 | 0,00 | 0,00 |
| 2356 | 1,06 | 0,35 | 15,40 | 0,00 | 0,00 |
| 2357 | 1,30 | 0,53 | 7,00 | 0,00 | 8,73 |
| 2358 | 1,82 | 0,81 | 9,80 | 0,00 | 5,60 |
| 2359 | 7,46 | 0,18 | 16,80 | 0,00 | 0,00 |
| 2360 | 1,72 | 0,32 | 12,60 | 0,00 | 4,20 |
| 2361 | 4,12 | 0,53 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2362 | 2,51 | 0,07 | 9,80 | 0,00 | 4,20 |
| 2363 | 1,81 | 0,81 | 9,80 | 0,00 | 0,00 |
| 2364 | 2,70 | 0,07 | 37,80 | 0,00 | 7,07 |
| 2365 | 1,20 | 1,37 | 11,20 | 0,00 | 0,80 |
| 2366 | 2,53 | 2,21 | 12,60 | 0,00 | 41,47 |
| 2367 | 3,16 | 0,46 | 16,80 | 0,00 | 9,67 |
| 2368 | 1,62 | 0,56 | 8,40 | 0,00 | 10,67 |

Continua...

Continuação...

| Nº coleção | AIA ¹ | AIA ² | FBN | Solubilização de fosfato | Sideróforos |
|------------|--------------------------------|------------------|-------|---------------------------------|-------------|
| | -----µg mL ⁻¹ ----- | | | -----Diâmetro do halo (mm)----- | |
| 2369 | 1,40 | 0,63 | 14,00 | 0,00 | 8,27 |
| 2370 | 0,75 | 1,16 | 14,00 | 0,00 | 18,40 |
| 2371 | 0,51 | 0,14 | 16,80 | 5,97 | 27,20 |
| 2372 | 0,56 | 0,18 | 14,00 | 10,08 | 30,33 |
| 2373 | 2,47 | 2,38 | 9,80 | 0,00 | 2,93 |
| 2374 | 10,36 | 2,35 | 18,20 | 0,00 | 33,13 |
| 2375 | 2,89 | 2,45 | 19,60 | 0,00 | 17,67 |
| 2376 | 11,90 | 2,70 | 5,60 | 0,00 | 3,67 |
| 2377 | 3,17 | 0,18 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2378 | 5,85 | 2,63 | 12,60 | 0,00 | 10,00 |
| 2379 | 1,12 | 0,18 | 15,40 | 0,00 | 8,13 |
| 2380 | 0,61 | 0,07 | 15,40 | 0,00 | 10,20 |
| 2381 | 1,46 | 1,05 | 16,80 | 0,00 | 15,87 |
| 2382 | 1,11 | 0,11 | 11,20 | 0,00 | 11,13 |
| 2383 | 0,99 | 0,56 | 12,60 | 0,00 | 0,00 |
| 2384 | 1,74 | 4,13 | 11,20 | 0,00 | 17,00 |
| 2385 | 0,64 | 0,21 | 23,80 | 0,00 | 39,67 |
| 2386 | 2,14 | 0,35 | 19,60 | 0,00 | 7,93 |
| 2387 | 0,84 | 0,28 | 11,20 | 7,22 | 23,53 |
| 2388 | 0,26 | 0,21 | 15,40 | 3,80 | 10,20 |
| 2389 | 1,67 | 1,93 | 12,60 | 8,13 | 36,07 |
| 2390 | 2,81 | 2,14 | 8,40 | 0,00 | 33,73 |
| 2391 | 26,95 | 2,24 | 8,40 | 0,00 | 10,93 |
| 2392 | 2,00 | 0,28 | 15,40 | 0,00 | 0,00 |
| 2393 | 6,06 | 3,40 | 11,20 | 0,00 | 17,07 |
| 2394 | 3,92 | 0,46 | 21,00 | 0,00 | 28,00 |
| 2395 | 4,87 | 0,60 | 11,20 | 0,00 | 11,40 |
| 2396 | 3,69 | 0,60 | 12,60 | 0,00 | 24,20 |
| 2397 | 1,38 | 0,42 | 8,40 | 0,00 | 2,47 |
| AbV5 | 16,04 | 0,91 | NA | 0,00 | 0,00 |
| AbV6 | 6,63 | 2,52 | NA | 0,00 | 0,00 |

AIA¹ na presença de triptofano; AIA² na ausência de triptofano. Ab = *Azospirillum brasilense*. NA = não analisado. N=3.

4.3.6 Crescimento Inicial de Plântulas de Milho Inoculadas com os Isolados

A maioria dos isolados promoveu aumento nos atributos avaliados em relação à testemunha (Figura 4.13). No geral, os isolados 2378 e 2364 (*Sphingomonas* e *Stenotrophomonas*, respectivamente) foram os que mais se destacaram em promover aumentos relativos da biomassa da planta, massa da parte aérea e massa de raízes. Os isolados 2364 e 2384 (*Bacillus*) promoveram

maior comprimento relativo e área relativa das raízes. O isolado 2378 promoveu o maior volume relativo de raízes. A inoculação da bactéria *A. brasilense* AbV6, usada como controle positivo, apresentou desempenho negativo em relação à testemunha sem inoculação, para todas as variáveis avaliadas.

A ilustração de raízes inoculadas com isolados que se destacaram na avaliação do crescimento inicial de plântulas de milho está na figura 4.12.

Figura 4.12 – Raízes de milho inoculadas com alguns dos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas que se destacaram na avaliação do crescimento inicial de plântulas de milho.

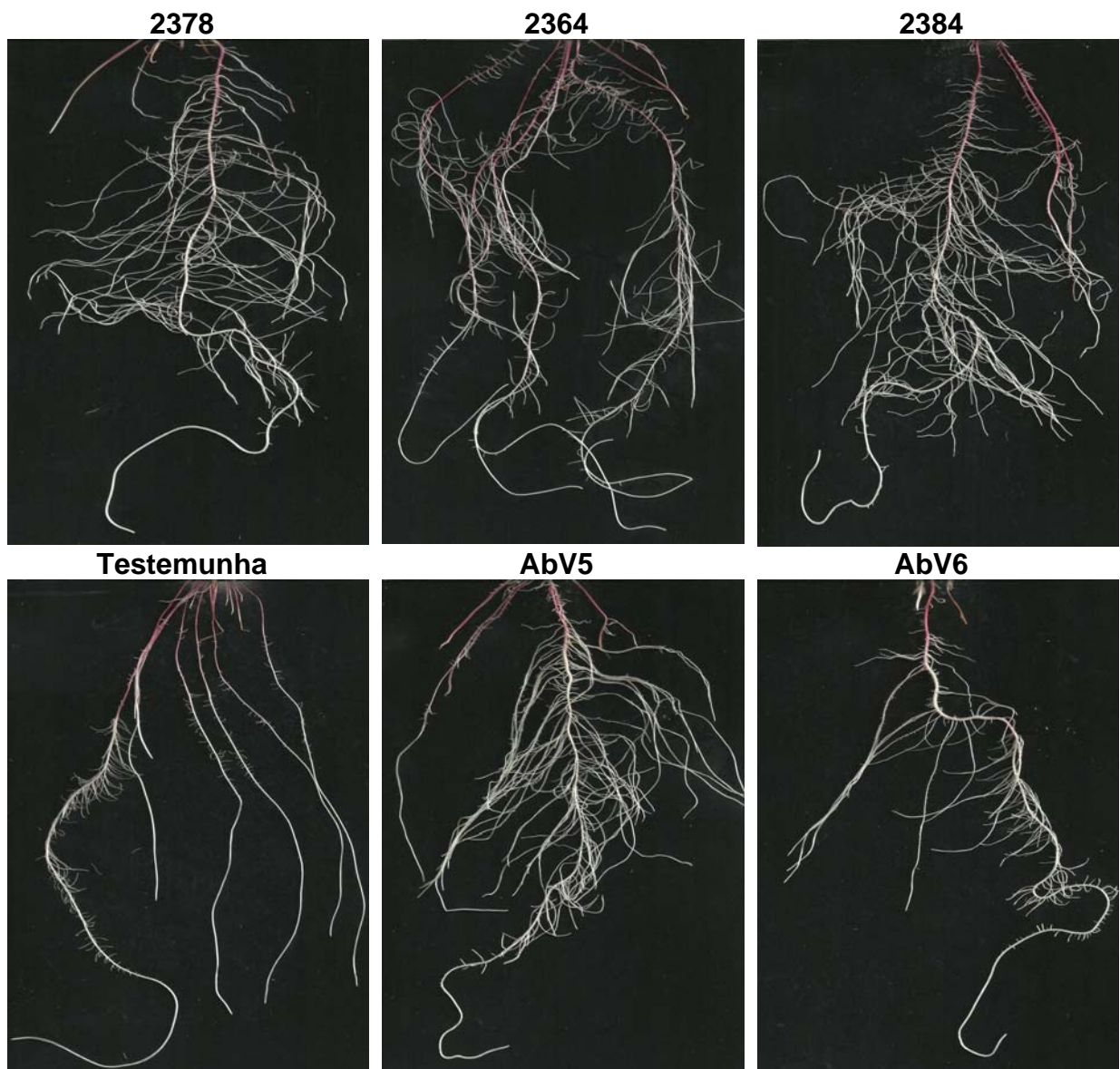
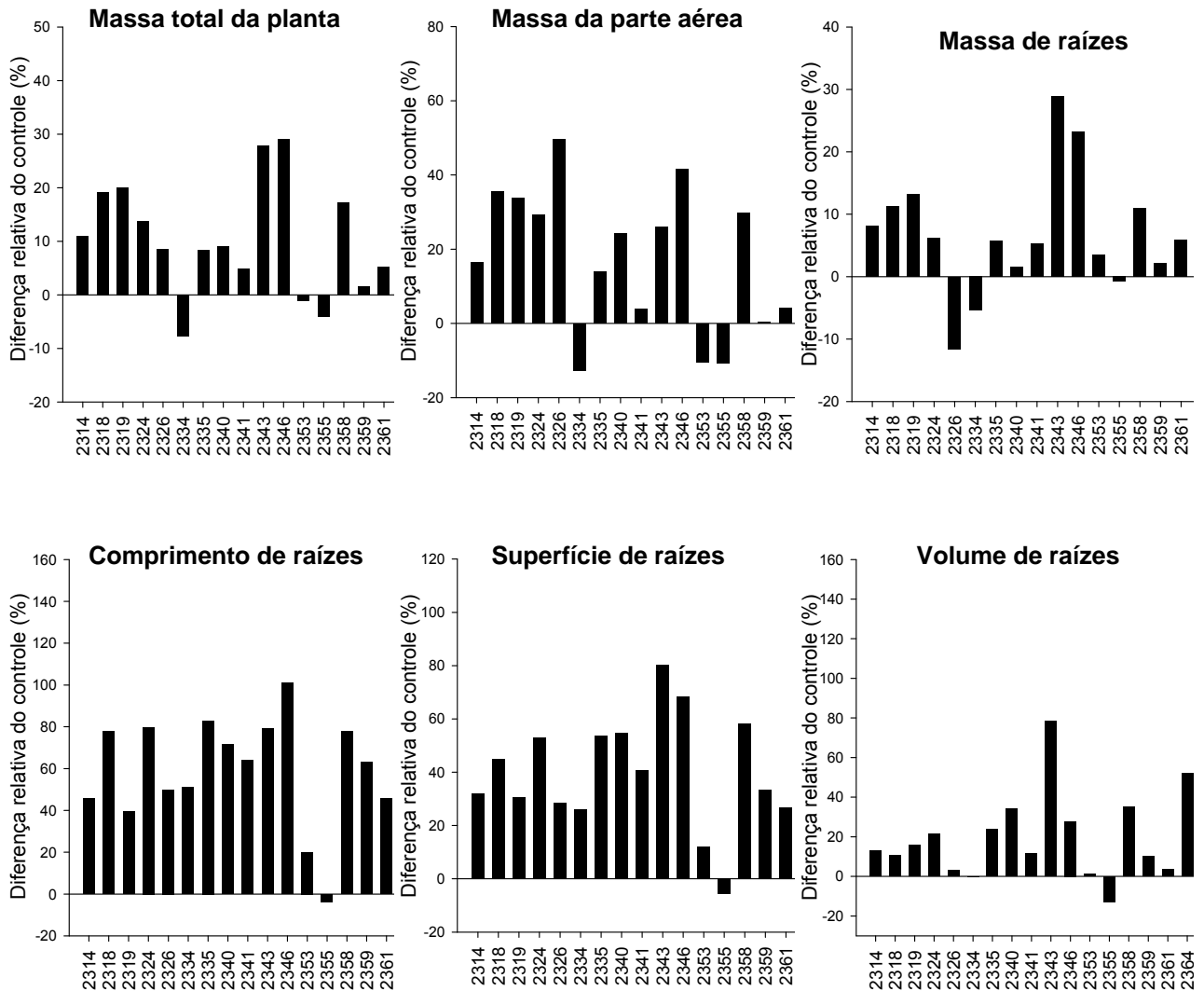


Figura 4.13 – Diferença relativa em porcentagem de atributos relacionados ao crescimento inicial de plantas de milho inoculadas com os isolados em relação ao controle sem inoculação. N=6.



4.4 DISCUSSÃO

A possibilidade de encontrar bactérias diazotróficas endofíticas com potencial para promover o crescimento vegetal é maior em sistemas agroecológicos, devido à ausência de pesticidas e de fertilizantes químicos, o que contribui para o aumento da diversidade microbiana associada às plantas (SHU et al., 2012). Fuentes-Ramirez et al. (1993) observaram menor frequência de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) que recebeu doses elevadas de N mineral. Neste estudo, o cultivo sob plantio direto em sistema

agroecológico foi o que apresentou maior ocorrência de bactérias diazotróficas. Em cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) orgânico sob diferentes períodos de adoção, a área sob cultivo orgânico mais antigo foi a que apresentou maior diversidade e quantidade de bactérias diazotróficas, incluindo *Alfa*, *Beta* e *Gammaproteobacteria* (SHU et al., 2012). As α - β - γ -*proteobacteria* e firmicutes são classes relatadas na literatura como bactérias diazotróficas e têm sido isoladas de diferentes culturas como arroz, cana-de-açúcar e milho (ROESCH et al., 2008; JHA et al., 2009; CIBICHAKRAVARTHY et al., 2012; SHU et al., 2012).

O meio de cultura JMV tem sido utilizado para o isolamento de *Burkholderia* sp., o que está de acordo com a maioria dos isolados obtidos com esse meio, cujo crescimento é uma típica película amarelo-alaranjada, devido à acidificação indicada pelo azul de bromotimol no meio (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). Há vários relatos da ocorrência desse gênero associado a plantas não leguminosas (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; JHA et al., 2009; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Nesse estudo, alguns isolados apresentaram alta similaridade com algumas espécies do gênero *Burkholderia*, entre elas *B. gladioli*, que apresentou similaridade com 15 isolados. Dois isolados foram similares às espécies *B. tropica* e três a *B. caribensis*. Já seis isolados foram similares às bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*.

O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) é um grupo constituído por nove espécies de bactérias patogênicas oportunistas que causam fibrose cística, dentre elas *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*. Por esta razão, na Europa existe uma moratória visando restringir a introdução de *Burkholderia* como inoculante na agricultura (BALANDREAU et al. 2001; PARKE; GURIAM-SHERMAN, 2001), pelo fato de estas espécies serem patógenas a humanos. Assim, mais estudos devem ser realizados antes da liberação desse gênero em grande escala no ambiente. Entretanto, é preciso considerar que essas bactérias já ocorrem naturalmente no ambiente, habitando plantas endofiticamente, como constatado no presente estudo. Apesar das preocupações sobre a patogenicidade do Bcc, muitas outras espécies de *Burkholderia* não patogênicas como *B. unamae*, *B. xenovorans*, *B. tropica*, *B. caribensis* e *B. silvatlantica* são filogeneticamente distintas de *B. cepacia* (CABALLERO-MELLADO et al., 2007) e têm potencial para uso em inoculantes visando à promoção de crescimento de plantas.

Considerando os isolados obtidos com o meio semi-sólido LGI livre de N, desenvolvido para o isolamento de *Azospirillum amazonense* (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007), nenhum exibiu as características fenotípicas de *Azospirillum* sp., o que foi confirmado pelo sequenciamento do gene *16S RNAr*. Este resultado indica que o meio LGI permite o crescimento de outras bactérias diazotróficas, dado que as bactérias pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Pseudoxanthomonas*, *Klebsiella*, *Leclercia* e *Dyella* foram isoladas com este meio de cultura, sendo que a maioria desses gêneros já foi encontrada por outros autores no interior de raízes de milho (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; PARK et al., 2005; ROESCH et al., 2008; MONTAÑEZ et al., 2012).

O meio de cultura JNFb tem sido utilizado para o isolamento de *Herbaspirillum* ssp., que são bactérias endofíticas (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). Melloni et al. (2004) constataram que embora o maior número de isolados tenha sido obtido com o uso do meio de cultivo seletivo JNFb, a análise de similaridade indicou que estes não foram necessariamente similares a *Herbaspirillum*, fato que corrobora esse estudo, pois as bactérias obtidas neste meio foram relacionadas a outros gêneros, como *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Klebsiella* e outros.

Doze isolados, obtidos somente no meio JNFb, apresentaram similaridade com *Agrobacterium tumefaciens*, pertencente à classe *Alphaproteobacteria*. Apesar de causar patogenicidade em diferentes plantas, isolados desse gênero foram encontrados endofiticamente no milho sem causar nenhum sintoma da doença; o mesmo foi observado por Chelius e Triplett (2001) e Montañez et al. (2012).

O fato de encontrar isolados com similaridade com *Rhizobium tropici* em raízes de milho não é raro. Roesch et al. (2008) encontraram alguns gêneros restritos ao caule do milho a partir do sequenciamento do gene *nifH*, entre eles *Rhizobium*. Jha et al. (2009) e Montañez et al. (2012) também encontraram espécies de *R. tropici* associadas endofiticamente a raízes de arroz e milho, respectivamente, utilizando os meios de cultura semi-sólidos NFb, JNFb, LGI e JMV. Estudos anteriores encontraram os mesmos gêneros encontrados nesse estudo, incluindo *Rhizobium* (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; PARK et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2007; ROESCH et al., 2008), vivendo endofiticamente em plantas de milho, trigo e

mandioca. Roesch et al. (2008) sugerem que a inoculação com *Rhizobium* sp. em leguminosas aumenta a quantidade desse gênero em associação com a cultura em sucessão, mesmo não leguminosa.

Uma ampla capacidade de produção de compostos indólicos foi observada entre os isolados, tanto na presença quanto na ausência de triptofano, sendo a segunda característica incomum entre bactérias (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). O isolado 2326 (*Stenotrophomonas* sp.) foi o que mais se destacou na produção de compostos indólicos na ausência de triptofano (6,44 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$ em 24 h de incubação) entre outros isolados com a mesma característica.

Em geral, os isolados desse estudo produziram quantidades de AIA na presença de triptofano equivalentes às reportadas na literatura, entretanto os tempos de incubação para avaliar a produção foram diferentes. Beneduzi et al. (2008) encontraram concentrações equivalentes (0,1-30 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) produzidas por isolados da classe *Bacilli* (*Bacillus* e *Paenobacillus*) obtidos de plantas de arroz, porém com tempo de incubação de 72 h; Castro-González et al. (2011) encontraram maiores produções (0,03-56,8 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) por espécies de *Burkholderia* spp. isoladas de plantas de cana-de-açúcar, em 18 h de incubação; Montañez et al. (2012) observaram produções bem mais elevadas (26,8-437,8 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) por isolados obtidos de plantas de milho, em 48 h de incubação. Todas as quantificações foram baseadas no método de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995). Entretanto, altas produções de compostos indólicos por microrganismos nem sempre são desejáveis, pois sabe-se que o excesso de auxinas pode inibir o crescimento das raízes (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Alguns isolados desse estudo apresentaram produções de AIA pouco maiores, outros abaixo dos teores produzidos pelas estirpes de *A. brasilense* (AbV5 e AbV6), cujo efeito promotor de crescimento já foi comprovado em gramíneas como milho e trigo (HUNGRIA et al., 2010). Os isolados 2326 e 2334 (*Stenotrophomonas* e *Burkholderia*) foram os que apresentaram as concentrações de AIA *in vitro* mais próximas de *Azospirillum* AbV5, ou seja, provavelmente essas bactérias são capazes de fornecer AIA para a planta em concentrações adequadas para promover o crescimento da cultura, sendo no caso do isolado 2326 por meio de vias dependentes e independentes de triptofano. Porém, a promoção de crescimento das plantas não é somente imposta pela produção de AIA, mas também outros

fitormônios como as giberelinas e citocinas, além da FBN (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

Dado que os isolados foram cultivados em meio de cultura isento de N, após quatro transferências, um enriquecimento de N observado no meio de cultivo é atribuível à FBN (BENEDUZI et al., 2008). Esses mesmos autores encontraram acúmulo de $6,8 \mu\text{g N mL}^{-1}$ no meio de cultura inoculado com *Bacillus* sp. Kuss et al. (2007) observaram níveis de N no meio de cultura variando de $5,6$ - $46,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os dois trabalhos foram avaliados de forma semelhante à do presente estudo, em que valores semelhantes foram encontrados. O isolado que mais enriqueceu o meio de cultura com N foi identificado como *Stenotrophomonas* sp. (2364), sendo que esse gênero já foi identificado como diazotrófico em diversas culturas (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; CIBICHAKRAVARTHY et al., 2012). Park et al. (2005) encontraram esse mesmo gênero com alta capacidade de fixar N *in vitro*, ou seja, é uma bactéria associativa que pode beneficiar as culturas pela FBN.

Considerando-se a solubilização de fosfato, somente os isolados relacionados ao gênero *Burkholderia* mostraram esta característica. É comum a ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato dentro desse gênero (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Rodriguez et al. (2006) observaram em um estudo com microrganismos promotores de crescimento vegetal, que o gênero *Burkholderia* parece ter facilitada a atividade da fosfatase extracelular, pelo gene que codifica uma proteína externa da membrana, que aumenta na ausência de fosfatos solúveis no meio. Entretanto, é preciso ressaltar que a solubilização de fosfato não ocorre por meio da ação de fosfatases, sendo que essa enzima atua apenas sobre formas orgânicas de fosfato, promovendo sua mineralização. Por outro lado, a grande maioria os isolados (62 de 86) produziu sideróforos em maiores ou menores quantidades, porém os isolados dos gêneros *Microbacterium*, *Klebsiella*, *Dyella* e *Pseudomonas* não apresentaram essa característica. Beneduzi et al. (2008) encontraram 22 de 296 isolados solubilizadores de fosfato, a maioria obtida de raízes de arroz, sendo que 32 isolados produziram sideróforos. Caballero-Mellado et al. (2007) obtiveram 54 isolados de *Burkholderia* de tomate, dos quais todos produziram sideróforos e apenas 24 foram solubilizadores de fosfato. Assim, a produção de sideróforos parece ser mais difundida entre microrganismos diazotróficos endofíticos do que a capacidade de solubilização de fosfato.

Os efeitos no crescimento inicial de plântulas de milho inoculadas com os isolados nem sempre foram condizentes com as potencialidades reveladas *in vitro*, como a produção de compostos indólicos, acúmulo de N *in vitro*, solubilização de fosfato e produção de sideróforos. Nesse caso, as bactérias que se destacaram em promover o crescimento inicial pertencem gêneros *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* e *Bacillus*. Os três gêneros são reconhecidos promotores de crescimento vegetal (PARK et al., 2005; BENEDUZI et al., 2008). Além disso, o isolado 2364 (*Stenotrophomonas*) apresentou o maior acúmulo N *in vitro*, ou seja, este isolado pode estar contribuindo para o crescimento vegetal pela FBN. Speapen et al. (2008) observaram que a inoculação de *A. brasilense* na concentração 10^6 células mL⁻¹ promovia o crescimento das plantas de trigo com uma semana, porém a concentração 10^9 células mL⁻¹ inibia o crescimento. Esse fato foi atribuído ao excesso de auxinas produzidas pelas bactérias. No presente trabalho, cada isolado foi inoculado na concentração 10^8 células mL⁻¹, o que pode ter inibido o crescimento das plântulas de milho em alguns casos, como por exemplo no caso da estirpe de *A. brasilense* AbV6. Montañez et al. (2012) também encontraram efeitos negativos no crescimento de milho inoculado com alguns isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Os autores concluíram que a promoção de crescimento de plantas parece não estar ligada apenas à produção de AIA e potencial capacidade de FBN revelada pela presença do gene *nifH*, sendo assim, interações planta-bactérias endofíticas devem ser melhor investigadas para elucidar os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas.

Microrganismos com capacidade de solubilização de fosfato, produção de sideróforos e auxinas são interessantes para aplicações biotecnológicas, como a produção de inoculantes que possam ser utilizados na agricultura visando a nutrição das plantas e o controle de agentes patogênicos da raiz, além de fixar N biologicamente. De acordo com esse trabalho, os isolados 2334, 2313 (ambos *Burkholderia*) e 2364 (*Stenotrophomonas*) são candidatos a serem componentes de novos inoculantes de promoção de crescimento vegetal. Dentre os critérios para sua sugestão, o primeiro é devido à quantidade compostos indólicos produzida, o segundo por solubilizar fosfato e produzir sideróforos e o terceiro pela capacidade de aumentar as massas de plântulas de milho, além de ambos resultarem em elevadas taxas de acúmulo de N *in vitro*. Porém o gênero

Burkholderia é mais restritivo, pois ainda passa por moratória e não pode ser liberado como produto biotecnológico.

Apesar da área sob sistema agroecológico apresentar maior ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas, ainda não é suficiente para dizer que nesse tipo de sistema há um maior benefício da associação com essas bactérias. Entretanto, a menor utilização de fertilizantes, defensivos, e menor revolvimento do solo associado à adubação orgânica, rotação de culturas e aumento da umidade podem colaborar para o aumento da comunidade de bactérias diazotróficas endofíticas (SHU et al., 2012). Assim, os resultados deste estudo enfatizam a importância de se considerar o manejo do solo sobre suas propriedades biológicas, a fim de obter maiores benefícios para as culturas a um menor custo e com menos impacto ambiental.

4.5 CONCLUSÕES

Todos os sistemas de produção de milho propiciaram a obtenção de isolados bacterianos endofíticos, com maior prevalência de bactérias diazotróficas pertencentes às classes *Alfa*, *Beta* e *Gamaproteobacteria* do que *Actinobacteridae* e *Bacilli*.

Foram encontrados vários isolados com características de promover o crescimento de plantas de milho, com destaque para os isolados 2313, 2334 e 2364. Estas estirpes podem ser úteis na formulação de novos inoculantes, principalmente para utilização em sistemas agroecológicos. Estirpes que combinem a capacidade de fixar nitrogênio com a produção de substâncias capazes de promover o crescimento de plantas, têm potencial para aumentar a produtividade da cultura de milho, principalmente em sistema agroecológico.

5 ARTIGO B

AZOSPIRILLUM spp. E PÓ DE ROCHAS NO CULTIVO DE MILHO (*Zea mays* L.) AGROECOLÓGICO

Resumo: A inoculação de bactérias diazotróficas como *Azospirillum* em milho (*Zea mays* L.) pode auxiliar na nutrição das plantas, sobretudo em condições de cultivo agroecológico, em que fontes de nutrientes de baixa solubilidade como pó de rochas são empregadas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. em milho sob sistema de produção agroecológico, em combinação com pós de basalto de três origens geológicas e fosfato natural. A experimentação foi realizada por duas safras (2009/10 e 2010/11) em duas localidades, Cruz Machado-PR (CM) e Irineópolis-SC (IRi). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com seis tratamentos de pós de rocha (parcela), em milho inoculado ou não com *A. lipoferum* no primeiro ano e *A. brasilense* no segundo (subparcela), com quatro repetições. Os tratamentos foram: 3 Mg/ha de pó de basalto de Paula Freitas (PF), Porto União (PU) e Irati (IR), 1 Mg/ha de fosfato natural de Registro (FN), 3 Mg/ha de pó de basalto PF + 1 Mg/ha de FN e um controle sem rochagem. O cultivo do milho (variedade crioula Caiano) foi consorciado com feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) na entrelinha. Antes da semeadura do milho e logo após a aplicação dos pós de rocha, a área foi cultivada com ervilhaca (*Vicia sativa* L.), utilizada como adubação verde de inverno. As leguminosas foram avaliadas quanto à produção de biomassa. Durante a cultura do milho, realizou-se diagnose foliar quanto aos teores de N e P na época do florescimento do milho, análises químicas do solo para fins de fertilidade e a produtividade de grãos ao final do ciclo. Avaliou-se ainda a ocorrência de bactérias diazotróficas na região basal do colmo do milho. Os dados foram submetidos à ANAVA e as médias comparadas pelo teste Tukey a 10%. Somente a biomassa fresca da ervilhaca na área de CM foi influenciada pelos pós de rocha, sendo que a associação de pós PF+FN resultou em maior biomassa. Na área de CM, em 2009/10, o teor foliar de N nas plantas de milho foi maior nos tratamentos inoculados com *A. lipoferum* na presença dos pós de basalto PF e PU, mas em 2010/11 foi constatado efeito isolado da inoculação com *A. brasilense* com maior teor de N nas plantas inoculadas. Em IRi, não houve efeito dos tratamentos ou subtratamentos nos dois anos de avaliação. Já o teor de P nas plantas foi alterado pelos tratamentos em CM somente no ano de 2009/10, mas em IRi o milho inoculado com *A. brasilense* apresentou maior teor de P que o não inoculado no ano de 2010/11. Nos dois anos houve maior densidade de bactérias diazotróficas endofíticas nas plantas inoculadas na área de CM. Na área de IRi a interação entre pó de rochas e bactéria só ocorreu em 2009/10. Não houve diferença significativa para os atributos químicos do solo e nem para a produtividade de grãos nos dois anos de avaliação.

Palavras-chave: Pó de basalto. Fosfato de rocha. Adubação verde. Fertilizantes alternativos.

5.1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos principais componentes do agronegócio brasileiro, além de servir como alimentação humana e animal, *in natura* ou industrializado. Embora existam sistemas produtivos altamente tecnificados baseados em grandes aportes de insumos como fertilizantes e defensivos agrícolas (EI ZEMRANY et al., 2006), ainda há em várias regiões do país sistemas baseados em baixo aporte de insumos, devido aos seus elevados custos, ou mesmo por opção, como no caso dos sistemas agroecológicos de produção.

O nitrogênio (N) é o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas, mas é geralmente encontrado em baixas concentrações nos solos brasileiros e, dependendo da cultura, representa um dos principais componentes do custo de produção. Frente ao grande aumento nos custos dos insumos industrializados ocorrido recentemente, o seu emprego fica proibitivo para pequenos produtores. Além disso, fontes sintéticas de fertilizantes não são empregadas nos sistemas agroecológicos de produção. Nesse caso, uma alternativa é o uso de fontes de N orgânico que são provenientes principalmente da biomassa de plantas leguminosas e gramíneas usadas no consórcio ou em sucessão com as culturas principais (CARDOSO; NOGUEIRA; FERRAZ, 2007), enquanto P, Ca, Mg, K e micronutrientes são fornecidos por pós de rocha de baixa solubilidade (THEODORO; LEONARDOS, 2006). Além do N orgânico, outro ponto fundamental para a incorporação de N no sistema agrícola é a contribuição da fixação biológica de N₂ (FBN), realizada por bactérias diazotróficas.

A associação de bactérias diazotróficas na cultura do milho traz benefícios para as plantas como a promoção do crescimento pela produção de fitormônios, indução de resistência a patógenos e a redução na utilização de fertilizantes nitrogenados (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; CASTRO-GONZÁLEZ et al. 2011), além dos benefícios ambientais e sociais. Em trigo, a inoculação com bactérias diazotróficas promove a melhor absorção e utilização do N disponível no sistema de produção (SALA et al., 2007; HUNGRIA et al., 2010).

Os benefícios relatados na literatura sobre a inoculação com *Azospirillum* spp. em espécies de uso agrícola são diversos. Esta diazotrófica associativa pode contribuir com o aumento da produção de massa seca total da planta, da quantidade de N da parte aérea e dos grãos, florescimento precoce,

aumento da produção e do peso específico de grãos, aumento da altura das plantas, comprimento das folhas, aumento da germinação das sementes e maior desenvolvimento do sistema radicular (BASHAN; LEVANONY, 1990; MIYAUCHI et al., 2008; HUNGRIA et al., 2010).

Assim, a possibilidade de inoculação de bactérias diazotróficas associativas permite vislumbrar seu potencial na contribuição da nutrição nitrogenada de plantas, sobretudo na cultura do milho sob condições de cultivo agroecológico. Os benefícios dessa tecnologia não são apenas econômicos, mas também ambientais, além de vir de encontro aos anseios almejados para o manejo de áreas sob agroecologia.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. em milho sob sistema de produção agroecológico em combinação com o uso de pó de basalto de três origens geológicas e fosfato natural como fontes alternativas de nutrientes na cultura do milho em sistema agroecológico de produção.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

A experimentação foi conduzida em propriedades de agricultores familiares em Cruz Machado-PR (25° 59' 54" S, 51° 14' 00" W) e Irineópolis-SC (26° 19' 10" S, 50° 48' 48" W) (Figura 5.1). O pó de basalto vem sendo utilizado por grupos de agricultores experimentadores das regiões visando minimizar os custos de produção e reduzir os impactos ambientais, além de constituir uma fonte de nutrientes adequada ao sistema agroecológico de produção.

Figura 5.1 – Foto de satélite da área experimental em Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC. Fonte: Google Earth.



Foram realizadas duas avaliações simultâneas, a primeira visando avaliar a eficiência de pós de basalto e de um fosfato como fonte de nutrientes, em combinação com a prática de inoculação ou não com *Azospirillum* spp. na cultura do milho e a possível interação entre tratamentos.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com seis tratamentos de pó de rocha e dois subtratamentos, com e sem inoculação do milho com *Azospirillum* spp, arranjados em parcelas subdivididas, em quatro repetições. Os tratamentos das parcelas foram: testemunha sem adição de pó, 3 Mg/ha de pó de basalto PF (Paula Freitas, PR), 3 Mg/ha de pó de basalto PU (Porto União, SC), 3 Mg/ha de pó de basalto IR (Iratí, PR), 1 Mg/ha de fosfato natural (Registro, SP) e 3 Mg/ha de pó de basalto PF+ 1 Mg/ha de fosfato natural. Os basaltos PF e IR são básicos, ou seja, com maiores teores de Ca e Mg. Já o basalto PU é ácido, com maiores teores de Si e K (Tabela 5.1). Os basaltos PF e IR são usados tradicionalmente pelos agricultores da região, enquanto o PU não é utilizado, mas tem potencial como fonte de K, conforme revelou a análise química. A combinação de uma das fontes de basalto com fosfato de natural de rocha (FN) se deve ao fato de que os basaltos são pobres em P, sendo que essa combinação foi avaliada apenas com o basalto PF pelo fato deste ser utilizado por cerca de 90% dos

agricultores que usam pó de basalto na região. O uso da dose 3 Mg/ha foi baseado em estudos prévios de Almeida, Silva e Ralisch (2007), indicando que essa foi a dose que resultou em maior rendimento da cultura do milho. As doses de pó de rocha foram aplicadas metade em área total antes do estabelecimento da adubação verde de inverno com ervilhaca e a outra metade no sulco de semeadura do milho no primeiro ano. Nas subparcelas foram avaliados os efeitos da inoculação do milho com *Azospirillum lipoferum* no primeiro ano e *Azospirillum brasilense* no segundo ano. Cada parcela tinha 10 m x 10 m, espaçadas de 2 m entre si. Os experimentos foram conduzidos por dois anos consecutivos (safra 2009/2010 e 2010/2011), sendo que a aplicação dos pós de rocha foi feita somente no primeiro ano (2009).

Tabela 5.1 – Resultado da análise química dos pós de rocha provenientes de Paula Freitas (PF) e de Porto União (PU).

| Constituinte (%) | Pó de rochas | | Elemento (mg kg ⁻¹) | Pó de rochas | |
|--------------------------------|--------------|---------|---------------------------------|--------------|-----|
| | PF | PU | | PF | PU |
| SiO ₂ | 51,13 | 65,46 | Sr | 206 | 192 |
| Al ₂ O ₃ | 13,99 | 12,41 | Zr | 103 | 174 |
| TiO ₂ | 1,21 | 1,05>UL | Nb | 9 | 28 |
| Fe ₂ O ₃ | 13,48 | 7,04>UL | Y | 15 | 52 |
| CaO | 10,79>UL | 3,28 | Rb | 13 | 173 |
| MgO | 6,70 | 1,56 | Ba | 48 | 701 |
| K ₂ O | 0,51 | 3,37 | Cu | 181 | 150 |
| Na ₂ O | 2,10 | 4,01 | Zn | 92 | 101 |
| MnO | 0,19 | 0,13>UL | V | 139 | 114 |
| P ₂ O ₅ | 0,12 | 0,30>UL | Cr | 180 | 21 |
| PF | 0,31 | 1,35 | La | 22 | 52 |
| Total | 100,54 | 99,97 | Ni | 89 | 52 |

Análises realizadas pelo Laboratório Ekosolos Indústria Remineralizadora de Solos Ltda. PF= Perda ao fogo; >UL= Acima do limite superior da curva.

Após a aplicação dos pós de rocha no inverno de 2009 foi semeada ervilhaca como planta de cobertura de inverno, para posterior estabelecimento da cultura do milho. Na época do florescimento, a ervilhaca foi rolada com rolo-faca para a semeadura direta do milho, ocasião em que se avaliou a biomassa fresca e seca das plantas. As espécies utilizadas em consórcio ou como adubo verde de inverno são comumente adotadas pelos agricultores da região. O milho da variedade crioula Caiano foi cultivado consorciado com feijão-de-porco na entrelinha no ciclo de verão. Em metade de cada parcela (5 x 10 m) do tratamento principal, as sementes de milho foram inoculadas com as bactérias diazotróficas *Azospirillum*

lipoferum (inoculante turfoso, no primeiro ano, com a estirpe BR 11080, fornecida pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ) ou *Azospirillum brasilense* (inoculante líquido, no segundo ano, com as estirpes AbV5 e AbV6, fornecidas pela Embrapa Soja, Londrina-PR), ou mantidas sem inoculação. O número de células viáveis nos dois inóculos foi aproximadamente 10^8 células g^{-1} ou mL^{-1} de inoculante.

Durante o cultivo do milho foram realizadas amostragens nas folhas para diagnose nutricional (BATAGLIA et al., 1983) quanto aos teores de N e P na época do florescimento, e do solo na profundidade 0-20 cm nas parcelas para fins de avaliação química da fertilidade (EMBRAPA, 1997). Além disso, foram feitas avaliações da produtividade da cultura de milho e biomassa fresca e seca do feijão-de-porco cultivado na entrelinha. Avaliou-se ainda a densidade de bactérias diazotróficas endofíticas de amostras da região basal do colmo do milho pela técnica do número mais provável em tubos múltiplos (DÖBEREINER et al., 1995).

O conjunto de dados foi submetido à análise de variância (ANAVA) com aplicação do teste F ($p < 0,10$). Constatado efeito significativo, foi aplicado o teste Tukey a 10% de probabilidade para comparação de médias. A ANAVA foi feita para cada propriedade e para cada ano de avaliação separadamente.

5.3 RESULTADOS

A produção de biomassa da ervilhaca (Figura 5.2) utilizada como adubo verde de inverno foi determinada somente no primeiro ano de avaliação (safra 2009/10). Somente em Cruz Machado houve efeito significativo dos tratamentos com pó de rocha, em que o pó de basalto PF associado ao fosfato natural proporcionou maior biomassa fresca da ervilhaca, que diferiu apenas do mesmo pó de rocha sem adição do fosfato natural. Já a biomassa seca não sofreu influência dos pós de rochas. Na área de Irienópolis, nem a biomassa fresca e nem a seca da ervilhaca foi influenciada pelos tratamentos (Tabela 5.2).

Figura 5.2 – Aspecto da ervilhaca cultivada como adubo verde de inverno (A); Rolo-faca usado sobre a cultura da ervilhaca antes do plantio do milho (B).



Tabela 5.2 – Biomassa fresca e seca da ervilhaca cultivada como adubo verde de inverno em solo que recebeu pós de basalto de diferentes origens geológicas e/ou fosfato natural, na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC, na safra de 2009/10.

| Tratamentos com pó de rochas | Biomassa (kg ha ⁻¹) | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | Biomassa fresca | Biomassa seca | Biomassa fresca | Biomassa seca |
| | Cruz Machado-PR | | Irineópolis-SC | |
| Testemunha | 16750 ab | 3730 | 18700 | 3280 |
| 0,5 Mg/ha FN | 17325 ab | 3850 | 18825 | 3370 |
| 1,5 Mg/ha PF | 16075 b | 3598 | 17275 | 3340 |
| 1,5 Mg/ha PU | 18075 ab | 3900 | 18625 | 3370 |
| 1,5 Mg/ha IR | 17700 ab | 3882 | 19675 | 3647 |
| 1,5 Mg/ha PF + 0,5 Mg/ha FN | 18375 a | 4010 | 18700 | 3332 |
| ANAVA | 0,07 | 0,26 | 0,55 | 0,72 |
| CV % | 8,67 | 8,86 | 12,83 | 14,34 |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade. PF= Pó de basalto de Paula Freitas; FN= Fosfato Natural; PU= Pó de basalto de Porto União; IR= Pó de basalto de Irati. N=4.

Durante o primeiro ano agrícola, houve ocorrência de períodos de estiagem nas duas áreas experimentais nos meses de novembro e dezembro de 2009 e janeiro a março de 2010, porém em Cruz Machado a estiagem foi até o começo de janeiro de 2010 (Figura 5.3 e 5.4), o que prejudicou o desenvolvimento das culturas, especialmente na fase final de enchimento de grãos. Apesar do ocorrido, alguns resultados positivos foram observados. Os experimentos foram reinstalados sobre as mesmas parcelas no segundo ano agrícola (2010/11), mas novamente ocorreu uma estiagem no inverno de 2010 (junho a outubro), o que

prejudicou o desenvolvimento da ervilhaca e, novamente, os veranicos prejudicaram a produtividade do milho.

Figura 5.3 – Dados meteorológicos da região de Cruz Machado-PR referentes aos meses de abril de 2009 a abril de 2011. Média mensal das temperaturas e precipitação acumulada. Fonte: Simepar.

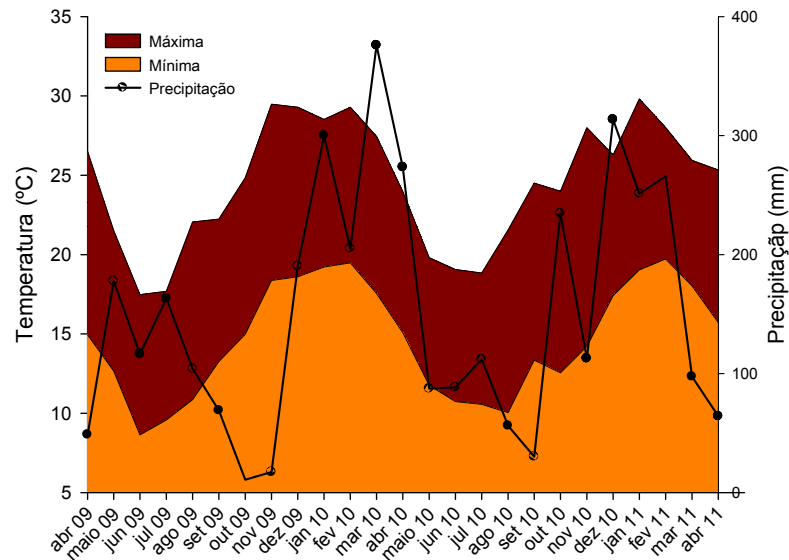
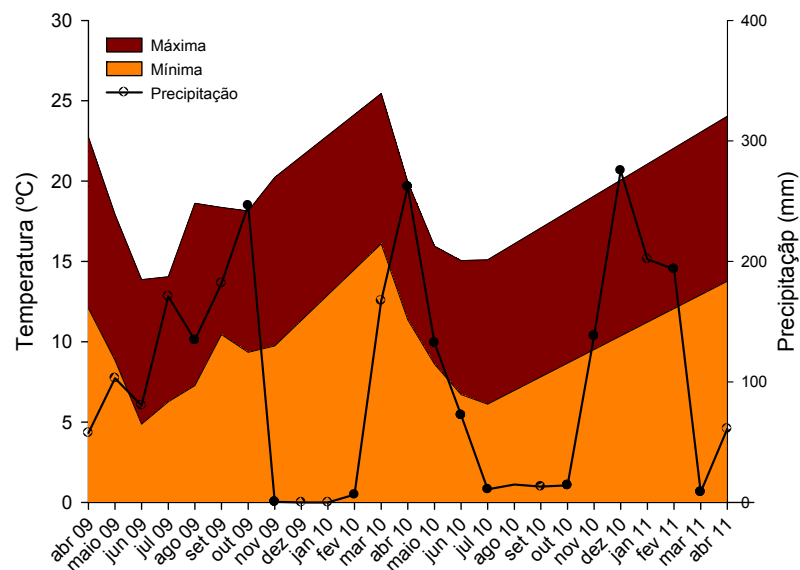


Figura 5.4 – Dados meteorológicos da região de Irineópolis-SC referentes aos meses de abril de 2009 a abril de 2011. Média mensal das temperaturas e precipitação acumulada. Fonte: Centro de Informação de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina-Epagri.



No primeiro ano de avaliação (safra 2009/2010), houve interação entre os tratamentos com pós de rocha e a inoculação com *Azospirillum* para os teores de N nas folhas de milho na área de Cruz Machado (Tabela 5.3). Nos tratamentos não inoculados não houve diferença significativa entre os tratamentos com pó de rocha, porém, nas plantas inoculadas com *A. lipoferum* o tratamento com pó de basalto PU resultou em maior teor de N na parte aérea do milho e o pó de basalto IR o menor teor. Quando avaliado o efeito da inoculação dentro de cada tratamento com pó de rocha, nos pós de basalto PF e PU, a inoculação aumentou o teor de N foliar, entretanto, no tratamento com pó de basalto IR, houve menor teor de N nas plantas inoculadas (Tabela 5.3).

Ainda em Cruz Machado, na safra 2010/2011, houve apenas efeito isolado da inoculação com *A. brasilense* (Figura 5.5), que resultou em maiores teores de N foliar no milho em comparação às plantas do tratamento não inoculado (Tabela 5.3). Quando comparado ao ano anterior, quando as plantas foram inoculadas com *A. lipoferum*, os teores médios de N nas plantas inoculadas e não inoculadas foram de 19 g kg^{-1} , enquanto que no ano seguinte esse valor se manteve nas plantas não inoculadas, mas aumentou nas plantas inoculadas para 23 g kg^{-1} , ano em que as plantas foram inoculadas com *A. brasilense*. O teor de N nas plantas de milho não foi influenciado pelos tratamentos em Irineópolis, nos dois anos de avaliação (Tabela 5.3).

Figura 5.5 – Aspecto das plantas de milho inoculadas (+) ou não (-) com *Azospirillum brasilense* na área experimental de Cruz Machado, na safra 2010/2011.



Tabela 5.3 – Teor foliar de nitrogênio (g kg^{-1}) das plantas de milho que receberam fertilização com pó de rochas e foram inoculadas ou não com *Azospirillum* spp., em experimentos conduzidos na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC.

| Tratamentos com pó de rochas | Teor de N (g kg^{-1}) | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------|----------------------|---------------|----------------------|
| | 2009/10 | | 2010/11 | | 2009/10 | | 2010/11 | |
| | Inocula do | Não inocula do | Inocula do | Não inocula do | Inocula do | Não inocula do | Inocula do | Não inocula do |
| | Cruz Machado-PR | | | | Irineópolis-SC | | | |
| Testemu nha | 18,69 abA | 18,97 aA | 21,13 | 19,52 | 15,68 | 17,36 | 20,37 | 19,32 |
| 1 Mg/ha FN | 18,90 abA | 19,60 aA | 23,91 | 19,59 | 15,47 | 15,54 | 18,46 | 18,21 |
| 3 Mg/ha PF | 20,02 abA | 18,13 aB | 22,81 | 18,24 | 15,33 | 14,21 | 18,75 | 16,59 |
| 3 Mg/ha PU | 20,86 aA | 18,20 aB | 22,70 | 18,94 | 14,63 | 14,14 | 17,74 | 17,50 |
| 3 Mg/ha IR | 17,57 bB | 19,81 aA | 24,25 | 19,19 | 15,47 | 16,17 | 17,98 | 18,85 |
| 3 Mg/ha PF + 1 Mg/ha FN | 17,99 abA | 19,39 aA | 23,91 | 18,03 | 16,17 | 15,47 | 20,98 | 18,61 |
| Médias | 19,00 | 19,01 | 23,11 A | 18,91 B | 15,45 | 15,48 | 19,04 | 18,17 |
| ANAVA T | 0,92 | | 0,85 | | 0,30 | | 0,18 | |
| ANAVA I | 0,98 | | 0,01 | | 0,95 | | 0,12 | |
| ANAVA TxI | 0,01 | | 0,45 | | 0,31 | | 0,51 | |
| CV % | 9,73 | | 9,80 | | 12,29 | | 10,00 | |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade. Letras minúsculas comparam na coluna e maiúsculas na linha dentro de cada ano de avaliação. PF= Pó de basalto de Paula Freitas; FN= Fosfato Natural; PU= Pó de basalto de Porto União; IR= Pó de basalto de Irati; T= tratamento com pó de rocha; I= inoculação. N=4.

O teor foliar de P foi pouco influenciado pelos tratamentos com pós de rocha e inoculação com *Azospirillum* spp. (Tabela 5.4). Efeito significativo dos pó de rochas foi observado apenas no primeiro ano, na área de Cruz Machado, com maiores teores no tratamento que recebeu apenas fosfato natural, não diferindo do tratamento que recebeu o pó de basalto PF. Em Irineópolis não houve efeito dos pós de rocha, porém houve efeito da inoculação com *A. brasilense* no segundo ano, sendo que as plantas inoculadas apresentaram maior teor de P (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Teor foliar de fósforo (g kg^{-1}) das plantas de milho que receberam fertilização com pó de rochas e foram inoculadas ou não com *Azospirillum* spp., em experimentos conduzidos na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC.

| Tratamentos com pó de rochas | Teor de P (g kg^{-1}) | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|---------|----------------|---------|
| | Cruz Machado-PR | | Irineópolis-SC | |
| | 2009/10 | 2010/11 | 2009/10 | 2010/11 |
| Testemunha | 0,51 b | 0,44 | 0,76 | 0,74 |
| 1 Mg/ha FN | 0,60 a | 0,49 | 0,72 | 0,81 |
| 3 Mg/ha PF | 0,55 ab | 0,46 | 0,77 | 0,77 |
| 3 Mg/ha PU | 0,51 b | 0,49 | 0,70 | 0,81 |
| 3 Mg/ha IR | 0,54 b | 0,49 | 0,76 | 0,79 |
| 3 Mg/ha PF + 1 Mg/ha FN | 0,53 b | 0,49 | 0,74 | 0,86 |
| Inoculado | 0,53 | 0,48 | 0,73 | 0,82 a |
| Não Inoculado | 0,53 | 0,46 | 0,74 | 0,76 b |
| ANAVA T | 0,01 | 0,52 | 0,73 | 0,26 |
| ANAVA I | 0,80 | 0,13 | 0,95 | 0,03 |
| ANAVA Txl | 0,83 | 0,11 | 0,42 | 0,27 |
| CV % | 7,50 | 8,60 | 8,93 | 10,48 |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade. PF= Pó de basalto de Paula Freitas; FN= Fosfato Natural; PU= Pó de basalto de Porto União; IR= Pó de basalto de Irati; T= tratamento com pó de rocha; I= inoculação. N=4.

Na safra 2009/2010, houve interação entre os tratamentos com pó de rochas e os níveis de inoculação para contagem de bactérias diazotróficas endofíticas no milho na área de Cruz Machado (Tabela 5.5). Não houve diferença significativa quando foram avaliados os efeitos dos tratamentos com pós de rocha dentro de cada nível de inoculação. Entretanto, em alguns casos, houve comportamento diferenciado da inoculação dentro de cada fonte de pó de rocha. Nesse caso, as plantas dos tratamentos testemunha e com pó de basalto IR apresentaram menor densidade de bactérias nas raízes quando inoculadas com *A. lipoferum*, enquanto os demais tratamentos não sofreram influência da inoculação. Na safra 2010/2011, o desdobramento da interação indicou que nas plantas inoculadas, as que receberam o pó de basalto PF apresentaram maior densidade de bactérias. Quanto ao efeito dos pós de rocha, não foram encontradas diferenças nas plantas não inoculadas, enquanto que as plantas inoculadas com *A. brasilense* do tratamento testemunha e com o pó de basalto PF apresentaram maiores densidades de bactérias em comparação ao respectivo tratamento não inoculado. Destaca-se, ainda, o fato de que o número de bactérias diazotróficas associadas às plantas de milho aumentou do primeiro para o segundo ano no tratamento inoculado. Já no tratamento sem inoculação, além da diferença ser menor, as plantas do tratamento

com pó PU apresentaram menor densidade de bactérias que no ano anterior (Tabela 5.5).

Por sua vez, em Irineópolis, somente na primeira safra houve interação entre pós de rocha e inoculação (Tabela 5.5). Novamente, somente houve efeito dos tratamentos com pós de rocha quando as plantas foram inoculadas, com maiores densidades de bactérias diazotróficas endofíticas nas plantas do tratamento com o pó de basalto PU, seguido do PF. Com exceção das plantas testemunha e das que receberam fosfato natural, as plantas dos demais tratamentos apresentaram maiores densidades de bactérias diazotróficas endofíticas quando inoculadas. No segundo ano de avaliação, houve apenas efeito isolado da inoculação com *A. brasilense*, situação em que as plantas do tratamento inoculado apresentaram maior densidade de bactérias diazotróficas em relação às do não inoculado. Nessa área não houve alterações relevantes de um ano para o outro em termos de densidade de bactérias endofíticas.

Tabela 5.5 – Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas no tecido cortical de plantas de milho que receberam fertilização com pó de rochas e foram inoculadas ou não com *Azospirillum* spp. em experimentos conduzidos na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC.

| Tratamentos com pó de rochas | Número mais provável de bactérias diazotróficas (NMP g ⁻¹) | | | | | | | |
|------------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Cruz Machado-PR | | | | Irineópolis-SC | | | |
| | 2009/10* | | 2010/11* | | 2009/10 | | 2010/11* | |
| | Inoculado | Não inoculado | Inoculado | Não inoculado | Inoculado | Não inoculado | Inoculado | Não inoculado |
| Testemunha | 1,94 10 ⁴ aB | 4,00 10 ⁴ aA | 1,44 10 ⁶ bA | 5,44 10 ⁴ aB | 9,75 10 ³ bA | 2,86 10 ⁴ aA | 3,08 10 ⁵ | 3,55 10 ⁵ |
| 1 Mg/ha FN | 1,05 10 ⁵ aA | 1,84 10 ⁴ aA | 6,03 10 ⁵ bA | 5,11 10 ⁴ aA | 3,23 10 ⁴ bA | 7,60 10 ³ aA | 4,70 10 ⁴ | 8,15 10 ⁴ |
| 3 Mg/ha PF | 2,43 10 ⁴ aA | 1,65 10 ⁴ aA | 3,94 10 ⁶ aA | 1,66 10 ⁵ aB | 8,57 10 ⁴ abA | 1,16 10 ⁴ aB | 1,35 10 ⁶ | 4,15 10 ⁴ |
| 3 Mg/ha PU | 4,33 10 ⁴ aA | 7,00 10 ⁴ aA | 1,09 10 ⁵ bA | 1,85 10 ⁴ aA | 1,58 10 ⁵ aA | 2,07 10 ⁴ aB | 2,56 10 ⁵ | 6,60 10 ⁴ |
| 3 Mg/ha IR | 7,62 10 ³ aB | 4,50 10 ⁴ aA | 6,99 10 ⁵ bA | 2,26 10 ⁵ aA | 6,93 10 ⁴ bA | 1,72 10 ⁴ aB | 4,09 10 ⁵ | 5,43 10 ⁴ |
| 3 Mg/ha PF + 1 Mg/ha FN | 1,68 10 ⁴ aA | 2,55 10 ⁴ aA | 7,04 10 ⁵ bA | 9,02 10 ⁴ aA | 7,07 10 ⁴ bA | 1,68 10 ⁴ aB | 2,62 10 ⁵ | 3,10 10 ⁴ |
| Médias | 3,61 10 ⁴ | 3,66 10 ⁴ | 1,13 10 ⁶ | 1,05 10 ⁵ | 7,10 10 ⁴ | 1,71 10 ⁴ | 4,46 10 ⁵ A | 1,07 10 ⁵ B |
| ANAVA T | 0,67 | | 0,08 | | 0,03 | | 0,62 | |
| ANAVA I | 0,02 | | 0,01 | | 0,00 | | 0,04 | |
| ANAVA TxI | 0,09 | | 0,04 | | 0,04 | | 0,24 | |
| CV % | 13,37 | | 14,50 | | 88,20 | | 14,60 | |

*Dados transformados (log x) para a análise estatística. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade. Letras minúsculas comparam na coluna e maiúsculas na linha dentro de cada ano de avaliação. PF= Pó de basalto de Paula Freitas; FN= Fosfato Natural; PU= Pó de basalto de Porto União; IR= Pó de basalto de Irati; T= tratamento com pó de rocha; I= inoculação. N=4.

A produtividade do milho não foi influenciada pelos tratamentos, sendo que a média em Cruz Machado foi de 3175 kg ha⁻¹ e em Irineópolis de 2300 kg ha⁻¹ na primeira safra e 2125 kg ha⁻¹ e 1140 kg ha⁻¹ na segunda safra, respectivamente. Nessa safra, a ocorrência de veranico durante a fase de enchimento de grãos também prejudicou o desenvolvimento da cultura.

Em Cruz Machado, a biomassa fresca do feijão-de-porco em consórcio com o milho avaliada na primeira safra não foi influenciada pelos tratamentos, mas a biomassa seca das plantas consorciadas com plantas de milho

inoculadas com *Azospirillum* aumentou em relação àquelas consorciadas com plantas de milho não inoculadas (Tabela 5.6). Em Irineópolis, somente a biomassa seca foi influenciada pelos tratamentos. Houve interação entre pós de rocha e inoculação, sendo que no tratamento não inoculado as plantas testemunha sem pó de rocha apresentaram maior biomassa seca, diferindo das que receberam fosfato natural. Quando as plantas de milho foram inoculadas, as que receberam pó de basalto PF apresentaram a maior biomassa de feijão-de-porco em comparação com as do tratamento testemunha e com o pó de basalto PU. Quando avaliado o efeito da inoculação do milho dentro de cada tratamento sobre a biomassa seca de feijão-de-porco, observa-se que as plantas cultivadas nas entrelinhas da testemunha não inoculada apresentaram maior biomassa seca em relação às cultivadas nas entrelinhas das plantas de milho inoculadas. Já as plantas dos tratamentos com pó PF e fosfato natural apresentaram resultado inverso. Para as plantas de feijão-de-porco dos demais tratamentos, não houve efeito da inoculação do milho (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Biomassa fresca e seca de feijão-de-porco cultivado nas entrelinhas da cultura de milho que recebeu fertilização com pó de rochas e foi inoculadas ou não com *Azospirillum* spp., em experimentos conduzidos na região de Cruz Machado-PR e Irineópolis-SC, na safra de 2009/10.

| Tratamentos com pó de rochas | Cruz Machado-PR | | | Irineópolis-SC | |
|------------------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---------------|
| | Biomassa fresca (kg ha ⁻¹) | Biomassa seca (kg ha ⁻¹) | Biomassa fresca (kg ha ⁻¹) | Biomassa seca (kg ha ⁻¹) | |
| | | | | Inoculado | Não Inoculado |
| Testemunha | 464,06 | 50,89 | 928,12 | 75,15 bB | 120,94 aA |
| 1 Mg/ha FN | 564,84 | 62,66 | 902,50 | 97,01 abA | 58,73 bB |
| 3 Mg/ha PF | 407,81 | 50,03 | 882,50 | 129,58 aA | 92,77 abB |
| 3 Mg/ha PU | 423,44 | 58,28 | 905,00 | 82,34 bA | 86,08 abA |
| 3 Mg/ha IR | 528,90 | 74,68 | 865,62 | 83,79 abA | 77,26 abA |
| 3 Mg/ha PF + 1 Mg/ha FN | 575,94 | 66,29 | 1019,37 | 113,69 abA | 93,94 abA |
| Inoculado | 543,01 | 67,98 a | 975,62 | - | - |
| Não Inoculado | 445,31 | 52,96 b | 858,75 | - | - |
| ANAVA T | 0,61 | 0,46 | 0,81 | 0,04 | |
| ANAVA I | 0,19 | 0,05 | 0,19 | 0,22 | |
| ANAVA TxI | 0,66 | 0,20 | 0,39 | 0,03 | |
| CV % | 23,75 | 21,78 | 13,43 | 11,84 | |

Dados transformados ($x^{0,5}$) para a análise estatística. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 10% de probabilidade. Letras minúsculas comparam na coluna e maiúsculas na linha dentro de cada ano de avaliação. PF= Pó de basalto de Paula Freitas; FN= Fosfato Natural; PU= Pó de basalto de Porto União; IR= Pó de basalto de Irati; T= tratamento com pó de rocha; I= inoculação. N=4.

Quanto aos atributos químicos do solo, não foi observado qualquer efeito dos tratamentos com pó de rocha em nenhuma das áreas avaliadas, nos dois anos de avaliação (Tabelas 5.7 e 5.8), com exceção da disponibilidade de fósforo pelo método de extração Mehlich. Na área de Cruz Machado, a disponibilidade de P foi maior nos tratamentos que receberam fosfato natural que os tratamentos que não receberam, conforme esperado, nos dois anos de avaliação. Na área de Irineópolis, também foi encontrado o mesmo resultado, porém somente na primeira safra. Na segunda safra, os tratamentos não influenciaram no teor de P disponível no solo avaliado com o extrator Mehlich I.

Tabela 5.7 – Resultado da análise química de amostras de solo (0-20 cm) dos experimentos de milho após a adição de pós de basalto e fosfato natural conduzidos na região de Cruz Machado-PR.

| Tratamentos com pó de rochas | P ^a | P ^b | C | pH ^c | Al | H ⁺ Al | Ca | Mg | K | SB | CTC | V | m | M O |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------|-----------------|---|----------------------|------|------|------|-------------|-------|------|------|--------|
| | mg/dm ³ | g kg ⁻¹ | | | -----cmol _c /dm ³ ----- | | | | | -----%----- | | | | |
| 2009/10 | | | | | | | | | | | | | | |
| Testemunha | 13,5 | 5,75 b | 56,10 | 4,82 | 0,08 | 4,90 | 5,92 | 2,12 | 0,23 | 8,28 | 13,19 | 62,6 | 0,64 | 9,67 |
| 1 Mg/ha FN | 14,0 | 10,89 a | 60,9 | 4,92 | 0,07 | 4,97 | 6,77 | 1,87 | 0,11 | 8,76 | 13,73 | 63,7 | 0,54 | 10,51 |
| 3 Mg/ha PF | 15,5 | 7,24 b | 60,7 | 4,81 | 0,16 | 4,88 | 6,30 | 1,90 | 0,16 | 8,36 | 13,24 | 63,0 | 1,24 | 10,47 |
| 3 Mg/ha PU | 11,3 | 7,31 b | 62,7 | 4,78 | 0,14 | 4,84 | 6,30 | 1,87 | 0,11 | 8,29 | 13,13 | 62,8 | 1,19 | 10,81 |
| 3 Mg/ha IR | 12,3 | 6,99 b | 62,1 | 4,78 | 0,14 | 4,83 | 6,75 | 1,50 | 0,12 | 8,37 | 13,20 | 63,3 | 1,09 | 10,71 |
| 3 Mg/ha PF + 1 Mg/ha FN | 11,8 | 13,46 a | 58,0 | 4,79 | 0,15 | 4,83 | 6,50 | 2,35 | 0,12 | 8,94 | 13,78 | 64,8 | 1,12 | 10,00 |
| ANAVA | 0,38 | 0,00 | 0,60 | 0,50 | 0,21 | 0,58 | 0,63 | 0,68 | 0,41 | 0,87 | 0,89 | 0,77 | 0,33 | 0,60 |
| CV % | 23 | 15,8 | 9,9 | 2,3 | 46,4 | 2,4 | 12,0 | 36,2 | 62,9 | 11,0 | 7,7 | 3,5 | 54,9 | 9,9 |
| 2010/11 | | | | | | | | | | | | | | |
| Testemunha | 15,3 | 4,86 b | 49,5 | 4,67 | 0,16 | 4,85 | 7,38 | 4,06 | 0,17 | 11,61 | 16,46 | 70,5 | 1,01 | 8,54 |
| 1 Mg/ha FN | 19,3 | 9,82 a | 49,3 | 4,72 | 0,16 | 4,92 | 7,58 | 4,03 | 0,12 | 11,73 | 16,65 | 70,4 | 1,02 | 8,51 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------|----------------|------|------|----------|------|------|------|------|-----------|-----------|------|------|----------|
| 3 Mg/ha PF | 17, 3 | 5,9 4 b | 47,5 | 4,67 | 0,1 9 | 4,87 | 7,33 | 3,90 | 0,18 | 11,4 1 | 16,2 9 | 69,9 | 1,28 | 8,2 0 |
| 3 Mg/ha PU | 18, 5 | 6,0 1 b | 47,9 | 4,67 | 0,2 2 | 4,85 | 7,21 | 3,68 | 0,18 | 11,0 8 | 15,9 3 | 69,5 | 1,52 | 8,2 7 |
| 3 Mg/ha IR | 19, 0 | 5,9 8 b | 49,9 | 4,70 | 0,1 6 | 4,90 | 7,41 | 3,55 | 0,15 | 11,1 2 | 16,0 2 | 69,3 | 1,06 | 8,6 1 |
| 3 Mg/ha PF + 1 Mg/ha FN | 15, 8 | 7,9 1 ab | 49,5 | 4,70 | 0,1 9 | 4,87 | 7,29 | 3,80 | 0,16 | 11,2 5 | 16,1 3 | 69,8 | 1,24 | 8,5 4 |
| ANAVA | 0,2 7 | 0,0 0 | 0,89 | 0,98 | 0,9 3 | 0,95 | 0,91 | 0,79 | 0,87 | 0,90 | 0,92 | 0,73 | 0,91 | 0,8 9 |
| CV % | 16, 3 | 24, 2 | 7,1 | 2,7 | 57, 7 | 2,6 | 6,4 | 15,0 | 52,2 | 8,3 | 6,5 | 1,8 | 62,1 | 7,1 |

PF= Pó de basalto de Paula Freitas; FN= Fosfato Natural; PU= Pó de basalto de Porto União; IR= Pó de basalto de Irati. ^a Resina; ^b Mehlich I; ^c CaCl₂. N=4.

Tabela 5.8 Resultado da análise química de amostras de solo (0-20 cm) dos experimentos de milho após a adição de pós de basalto e fosfato natural conduzidos na região de Irineópolis-SC.

| Tratamentos com pó de rochas | P ^a | P ^b | C | pH ^c | Al | H + Al | Ca | Mg | K | SB | CTC | V | m | MO |
|---------------------------------------|--------------------|---------------------|------|-----------------|---|--------|------|------|------|-------|-------------|------|------|------|
| | mg/dm ³ | g kg ⁻¹ | | | -----cmol _c /dm ³ ----- | | | | | | -----%----- | | | |
| 2009/10 | | | | | | | | | | | | | | |
| Testemunha | 13,5 | 12,20 _c | 41,4 | 4,68 | 0,22 | 5,04 | 6,97 | 1,75 | 0,65 | 9,38 | 14,42 | 64,7 | 1,58 | 7,15 |
| 1 Mg/ha FN | 15,8 | 15,89 _{ab} | 43,8 | 4,82 | 0,15 | 5,16 | 7,35 | 2,12 | 0,61 | 10,08 | 15,25 | 66,0 | 1,03 | 7,55 |
| 3 Mg/ha PF | 14,5 | 12,05 _c | 43,6 | 4,67 | 0,30 | 5,03 | 6,65 | 2,65 | 0,59 | 9,89 | 14,92 | 66,0 | 2,04 | 7,52 |
| 3 Mg/ha PU | 15,0 | 12,45 _c | 45,9 | 4,71 | 0,29 | 5,11 | 7,82 | 2,00 | 0,64 | 10,47 | 15,58 | 67,1 | 1,94 | 7,92 |
| 3 Mg/ha IR | 15,5 | 12,84 _{bc} | 42,2 | 4,67 | 0,19 | 5,03 | 7,00 | 1,45 | 0,58 | 9,03 | 14,07 | 64,1 | 1,37 | 7,28 |
| 3 Mg/ha PF + 1 Mg/ha FN | 16,5 | 16,86 _a | 41,2 | 4,79 | 0,15 | 5,20 | 9,45 | 0,95 | 0,63 | 11,03 | 16,23 | 67,1 | 0,85 | 7,11 |
| ANAVA | 0,13 | 0,00 | 0,42 | 0,27 | 0,37 | 0,34 | 0,29 | 0,51 | 0,71 | 0,67 | 0,61 | 0,80 | 0,35 | 0,42 |
| CV % | 9,7 | 11,4 | 8,0 | 2,3 | 56,5 | 2,5 | 23,1 | 68,6 | 12,1 | 18,1 | 12,1 | 5,5 | 59,2 | 8,0 |
| 2010/11 | | | | | | | | | | | | | | |
| Testemunha | 19,5 | 10,52 | 29,6 | 4,50 | 0,47 | 4,97 | 7,15 | 2,76 | 0,59 | 10,50 | 15,48 | 67,9 | 3,25 | 5,11 |
| 1 Mg/ha FN | 16,5 | 21,25 | 28,4 | 4,67 | 0,26 | 5,15 | 8,45 | 3,22 | 0,48 | 12,16 | 17,31 | 70,2 | 1,58 | 4,91 |
| 3 Mg/ha PF | 18,0 | 10,71 | 27,6 | 4,55 | 0,45 | 5,05 | 7,71 | 2,99 | 0,48 | 11,19 | 16,24 | 68,8 | 2,86 | 4,77 |
| 3 Mg/ha PU | 16,5 | 10,63 | 29,2 | 4,60 | 0,32 | 5,10 | 7,71 | 3,21 | 0,53 | 11,46 | 16,56 | 69,1 | 2,06 | 5,05 |
| 3 Mg/ha IR | 17,3 | 11,34 | 29,2 | 4,55 | 0,34 | 5,10 | 7,20 | 2,91 | 0,49 | 10,61 | 15,71 | 67,5 | 2,18 | 5,05 |
| 3 Mg/ha PF + 1 Mg/ha FN | 17,3 | 15,43 | 27,8 | 4,70 | 0,23 | 5,17 | 8,01 | 3,28 | 0,50 | 11,79 | 16,96 | 69,3 | 1,42 | 4,80 |
| ANAVA | 0,67 | 0,22 | 0,95 | 0,31 | 0,53 | 0,50 | 0,47 | 0,55 | 0,72 | 0,28 | 0,57 | 0,23 | 0,54 | 0,95 |
| CV % | 16,1 | 51,5 | 12,3 | 2,9 | 60,8 | 2,9 | 13,1 | 14,8 | 22,2 | 9,8 | 7,5 | 2,4 | 69,5 | 12,3 |

PF= Pó de basalto de Paula Freitas; FN= Fosfato Natural; PU= Pó de basalto de Porto União; IR= Pó de basalto de Irati. ^a Resina; ^b Mehlich I; ^c CaCl₂. N=4.

5.4 DISCUSSÃO

O uso de leguminosas como adubo verde propicia, além de N via FBN, o aumento da capacidade de absorção de fósforo do solo pelas plantas cultivadas (CARNEIRO et al., 2004) e, assim, melhora a disponibilidade de P para a cultura subsequente. Nesse caso, em Cruz Machado, a biomassa fresca da ervilhaca foi maior no tratamento que continha fosfato natural associado ao pó de rocha PF. Esse fato pode ter sido responsável pelo maior teor de P na cultura do milho cultivada na sequência, porém nesse caso, as plantas do tratamento apenas com fosfato apresentaram o maior teor de P. Microrganismos do solo associados à leguminosa ou estimulados pela deposição de sua biomassa na superfície do solo podem solubilizar fosfato e o tornar disponível gradativamente para as plantas. Carneiro et al. (2004) encontraram maiores densidades de bactérias solubilizadoras de fosfato em solos cultivados com feijão-guandu (*Cajanus cajan* L.) como adubo verde. Em Irineópolis, não houve diferença, tanto para a biomassa da ervilhaca quanto para o teor de P no milho, fato que pode ser explicado pela maior degradação desse solo, com menor teor de MO e, assim, uma menor atividade dos microrganismos solubilizadores de fosfatos (BRUSSAARD; RUITER; BROWN, 2007).

O teor de N e P, em alguns casos, foi maior nas plantas inoculadas com *Azospirillum* spp., como observado anteriormente (EL ZEMRANY et al., 2006; MIYAUCHI et al., 2008; HUNGRIA et al., 2010). Outro resultado interessante é que a estirpe *A. brasilense* empregada no segundo ano apresentou melhores resultados que a estirpe *A. lipoferum* empregada no primeiro, que pode ser um indicativo de que há uma maior eficiência entre a variedade de milho avaliada e o *A. brasilense*. É fato que diferentes genótipos de plantas podem responder diferentemente à associação com as bactérias. Miyauchi et al. (2008) observaram que algumas bactérias diazotróficas aumentavam o teor de N em certo genótipo de milho, mas em outro genótipo não foi encontrado o mesmo resultado. Essa diferença de resposta, embora não comparada entre as safras, também foi aparentemente constatada neste trabalho, em que cada espécie de *Azospirillum* apresentou efeito diferenciado no genótipo de milho avaliado.

O aumento do teor de N nas plantas de milho inoculadas pode ter sido influenciado pela inoculação com as estirpes de *Azospirillum* spp., mas também

pela associação de outras bactérias diazotróficas. No geral, nas duas áreas houve maior densidade de bactérias diazotróficas endofíticas nas plantas inoculadas, o que inclui não só o *A. lipoferum* e *A. brasilense*, mas também outras bactérias que podem ter contribuído para a fixação do N₂ e promoção do crescimento vegetal, visto que há uma gama de espécies bacterianas diazotróficas associadas às plantas de milho em condições de campo (ROESCH et al., 2008), o que é ainda mais esperado em condições de cultivo agroecológico (SHU et al., 2012).

Algumas bactérias diazotróficas podem solubilizar fosfato (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; CASTRO-GONZÁLEZ et al. 2011) e, assim, a presença dos pós de rocha fosfática pode ter estimulado a associação dessas bactérias com as plantas de milho. Isso sugere que a interação com bactérias benéficas vai além dos microrganismos introduzidos com a inoculação, mas depende também das condições que o manejo agrícola proporciona (BRUSSAARD; RUITER; BROWN, 2007). Em um solo com condições mais favoráveis ao desenvolvimento vegetal, com maiores teores de matéria orgânica, pH adequado, umidade e maior disponibilidade de nutrientes, possivelmente será um solo com maior diversidade bacteriana, que conseqüentemente poderá favorecer as interações bactérias-planta.

El Zemrany et al. (2006) também não encontraram diferenças na produtividade do milho inoculado com *A. lipoferum* em comparação aos controles com e sem adubação nitrogenada, porém, encontraram maior teor de N na parte aérea das plantas inoculadas e que também receberam fertilizante mineral nitrogenado, o que corrobora este estudo. No presente trabalho, não foi adicionada nenhuma fonte de N mineral, por se tratar de um experimento em sistema de produção agroecológico, embora também se tenham encontrado maiores teores de N na parte aérea das plantas inoculadas com *Azospirillum* spp.

A produtividade de milho observada nos experimentos foi baixa, sendo que a produtividade média das duas regiões foram superiores. Na região de Cruz Machado, para o ano de 2009, a produtividade média foi de 3,08 Mg ha⁻¹ e em 2010 foi 4,81 Mg ha⁻¹, enquanto que na região de Irineópolis foi ainda maior, com a produtividade média do milho no ano de 2009 de 5,67 Mg ha⁻¹ e em 2010 de 9,12 Mg ha⁻¹ (INFORMAÇÕES DO BRASIL, 2012). Porém, a produtividade média leva em consideração a produção de milho independente do sistema que é produzido, convencional ou agroecológico.

Embora alguns autores encontrem diferenças na produtividade das culturas utilizando pós de rocha (THEODORO; LEONARDOS, 2006), fontes de nutrientes de baixa solubilidade dependem da interação com microrganismos para a disponibilização dos nutrientes no solo (GYANESHWAR et al., 2002). Se o sistema de manejo não incorpora matéria orgânica ao solo, a densidade e a diversidade de microrganismos irão diminuir (BRUSSAARD; RUITER; BROWN, 2007) e conseqüentemente reduzirão a solubilização dos pós de rocha e a FBN.

A adição de pós de rocha não resultou em efeitos significativos no curto prazo nas propriedades químicas do solo, com exceção do teor de P disponível estimado pelo extrator Mehlich. Porém, como se trata de um extrator ácido, este pode ter superestimado a extração, indicando um teor de P que não está disponível para a planta, sendo assim, a avaliação do P pelo método de resina é mais indicada.

Por ser um produto de baixa solubilidade, espera-se que os eventuais efeitos pudessem ser observados em longo prazo, mas não logo nos primeiros anos do experimento. Pela sua baixa solubilidade, mesmo após dois anos da adição dos pós de rocha, não foram notados efeitos na fertilidade do solo, embora efeitos possam vir a ser observados no longo prazo. No trabalho de Theodoro e Leonardos (2006), com cinco anos de avaliação após a aplicação dos pós de rocha, efeitos positivos passaram a ser detectados. Isso indica a necessidade de períodos maiores de avaliação desse sistema para que resultados mais expressivos possam ser observados. Assim, mais informações devem ser buscadas em diferentes condições de solo e tempos de adoção do sistema agroecológico, especialmente em relação ao efeito residual da aplicação do pó de basalto e do fosfato natural.

É preciso considerar, também, que estudos de eficiência de fontes de nutrientes são preliminares e possibilitam obter apenas indicativos iniciais sobre o potencial de uso agrônômico das fontes testadas. Além disso, a determinação de índices de eficiência a partir de dados de poucos cultivos e da quantidade de nutrientes contida na matéria seca das plantas não necessariamente expressam o real valor agrônômico das fontes. São necessários anos de adoção do sistema agroecológico juntamente com as práticas de inoculação de bactérias diazotróficas e rochagem para obter resultados mais consistentes, embora resultados promissores já sejam constatados com duas safras consecutivas, apesar da estiagem ocorrida nas duas localidades, o que certamente comprometeu os resultados.

Entretanto, a inoculação com *Azospirillum* spp. se mostrou benéfica nesse sistema agroecológico. A inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas é feita com a finalidade de reduzir a adição de N e aumentar a rentabilidade da cultura (KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKÉS, 2004; SALA et al., 2007; HUNGRIA et al., 2010), porém o emprego de inoculantes em milho, na maioria dos estudos, se dá com adição de adubação nitrogenada, visto que a associação do *Azospirillum* spp. com as gramíneas não fornece a maior parte do N que a cultura necessita, como no caso do *Bradyrhizobium* sp. na cultura de soja do Brasil. Assim, o agricultor agroecológico pode adotar estratégias de cultivo e conservação dos recursos naturais com as ferramentas que foram estudadas nesse trabalho, como a adubação verde, a rochagem e a fixação biológica de nitrogênio, afim de, em um longo período de implantação desse sistema, obter melhores resultados a um custo mais baixo para o produtor e para o ambiente.

5.5 CONCLUSÕES

A inoculação com *Azospirillum* spp. beneficia as plantas em sistema agroecológico de produção.

Os pós de basalto de Paula Freitas e de Porto União foram os que mostraram melhores resultados em associação com o *Azospirillum* spp. na cultura do milho, em relação ao teor de N e densidade de bactérias diazotróficas endofíticas na planta.

O fosfato natural associado ou não ao pó de basalto resultou em maiores teores foliares de P nas plantas de milho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe uma grande diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de milho cultivadas por agricultores familiares, tanto em sistema agroecológico, quanto convencional de baixo insumo. A grande maioria dessas bactérias é benéfica às plantas de alguma forma, sendo encontrados isolados capazes de promover o crescimento de plantas de milho, com destaque para os isolados 2313, 2334 (ambos *Burkholderia*) e 2364 (*Stenotrophomonas*).

Apesar do gênero *Burkholderia* se destacar com espécies que auxiliam as plantas de alguma forma, seja como promotora de crescimento, seja no controle biológico de patógenos, esse gênero passa por moratória internacional para utilização na agricultura, sendo assim, é preciso considerar que mais estudos devem ser feitos com relação ao uso desse gênero para aplicações biotecnológicas.

Com base no isolamento, a partir de agora, novas investigações moleculares devem ser realizadas, baseada no estudo de genes relacionados a fixação de N₂ (genes *nif*), produção de auxina (genes *ipdC*) e produção de sideróforos (genes *fegA* e *fhuA*). E além desses genes, outras análises moleculares devem ser feitas, a fim de descrever possíveis novas espécies que foram encontradas em associação com plantas de milho.

A associação de *Azospirillum lipoferum* e *brasiliense* com plantas de milho se mostrou uma alternativa benéfica e viável para o pequeno produtor. Essa associação, juntamente com a adição dos pós de basalto de Paula Freitas e Porto União, aumenta o teor foliar de N e a densidade de bactérias diazotróficas associativas na planta. O fosfato natural associado ou não ao pó de basalto de Paula Freitas resulta em maiores teores foliares de P no milho.

A utilização de pós de rocha em sistemas agroecológicos tem mostrado resultados vantajosos, como relatam os pequenos agricultores que utilizam essas fontes alternativas de nutrientes. Na literatura são vários os trabalhos que mostram resultados de incrementos de produtividade e melhora na fertilidade do solo. Porém, apesar de não observar aumentos na produtividade do milho e fertilidade do solo, mais tempo de avaliação após a adoção desse sistema deve ser empregado para obter resultados mais expressivos, visto que a determinação da eficiência do pó de rocha, a partir de dados de poucos cultivos e, da quantidade de nutrientes contida na matéria seca das plantas, não são suficientes para descartar

ou adotar fontes de baixa solubilidade como essas. Futuras pesquisas com os mesmos tratamentos e com maiores tempos de aplicação dos pós devem ser analisadas para revelar conclusões mais concretas, com relação a essa prática em sistemas agroecológicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.; SILVA, F. JR. P.; RALISCH, R. Revitalização dos solos em processos de transição agroecológica no sul do Brasil. **Agriculturas**, v. 4, n. 1, 2007.
- ALTIERI, M. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 5.ed. Porto Alegre : Editora da UFRGS, 2008. 120 p.
- AMABILE, R. F.; FANCELLI, A. L.; CARVALHO, A. M. Absorção de N, P e K por espécies de adubos verdes cultivadas em diferentes épocas e densidades num latossolo vermelho-escuro argiloso sob cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 837-845, 1999.
- ARAÚJO, A. P.; ALMEIDA, D. L. de. Adubação verde associada a fosfato de rocha na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 245-251, 1993.
- ASSIS, L.; ROMEIRO, A. R. Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, n. 6, p. 67-80, 2002.
- BAGAYOKO, M.; ALVEY, S.; NEUMANN, G.; BUERKERT, A. Root-induced increases in soil pH and nutrient availability to field-grown cereals and legumes on acid sandy soils of Sudano-Sahelian West Africa. **Plant and Soil**, v. 225, p. 117-127, 2000.
- BALANDREAU, J., VIALARD, V., COURNOYER, B., COENYE, T., LAEVENS, S. Y VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 982-985, 2001.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p. 591-608, 1990.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. **Métodos de análise química de plantas**. Instituto Agronômico, Campinas, Boletim Técnico 78, 1983. 48p.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; BODANESE-ZANETTIN, 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.
- BERTOSSI, A. P. A.; CARDOSO, M. S. N.; PRADO, A. C. A.; POLIDORO, J. C.; GARCIA, G. O.; NEVES, M. A. Influência de resíduo de serragem de mármore na condutividade hidráulica do solo e na qualidade da água. **Revista de Ciências Agrárias**, p. 123-134, 2011.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BRANCO, S. M.; MURGEL, P. H.; CAVINATTO, V. M. Compostagem: solubilização biológica de rocha fosfática na produção de fertilizante organomineral. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Taubaté, v. 6, n. 3, p. 115-122, 2001.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen-total. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (eds) **Methods of soil analysis**, part 2: Chemical and microbiological properties. Madison: American Society of Agronomy, p. 595-624, 1982.

BRUSSAARD, L.; RUITER, P.C.; BROWN, G.G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 121, p. 233-244, 2007.

BUERKERT, A.; BATIONO, A.; PIEPHO, H. P. Efficient phosphorus application strategies for increased crop production in sub-Saharan West Africa. **Field Crops Research**, v. 72, p. 1-15, 2001.

BURG, I.C.; MAYER, P.H. **Alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças**. 30 ed. Francisco Beltrão: Grafit Gráfica e Editora Ltda, 2006. 153 p.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MARTINEZ-AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5308-5319, 2007.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. **Agroecologia! Enfoque científico e estratégico para apoiar o desenvolvimento rural sustentável**. Porto Alegre: EMATER/RS, 2002. 48 p.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A.; FERRAZ, S. M. G. Biological N₂ fixation and mineral N in common bean–maize intercropping or sole cropping in southeastern Brazil. **Experimental Agriculture**, v. 43, p. 319-330, 2007.

CARNEIRO R. G.; MENDES I. C.; LOVATO P.E.; CARVALHO A. M.; VIVALDI L. J. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 661-669, 2004.

CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 345, p. 155-169, 2011.

CERETTA, C. A.; BASSO, C. J.; FLECHA, A. M. T.; PAVINATO, P. S.; VIEIRA, F. C. B.; MAI, M. E. M. Manejo da adubação nitrogenada na sucessão aveia preta/milho, no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 163-171, 2002.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays*. L. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 252-263, 2001.

CIBICHAKRAVARTHY, B.; PREETHA, R.; SUNDARAM, S. P.; KUMAR, K.; BALACHANDAR, D. Diazotrophic diversity in the rhizosphere of two exotic weed plants, *Prosopis juliflora* and *Parthenium hysterophorus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 605-613, 2012.

CIRILLO, B. **Autossuficiência é meta de longo prazo em adubos**. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/biotecnologia/noticia/autossuficiencia-e-meta-de-longo-prazo-em-adubos_144322.html>. Acesso em: 25 de setembro de 2012.

CONCEIÇÃO, P. C.; AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; SPAGNOLLO, E. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 777-788, 2005.

CRANFIELD, J.; HENSON, S.; HOLIDAY, J. The motives, benefits, and problems of conversion to organic production. **Agriculture and Human Values**, v. 27, p. 291-306, 2010.

CUNHA NETO, M. 2012. **Mais um ano de recordes?** SAFRA Revista do Agronegócio. Disponível em: <http://www.revistasafra.com.br/?pagina=noticia_conteudo&&cod=44>. Acesso em: 24 de setembro de 2012.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S. & OKON, Y. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871-879, 2001.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; BALDANI, I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. EMBRAPA – SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB. Documento ISBN 85-85007-65-6, 1995. 60 p.

DÖBEREINER, J.; DAY, V. **Proceedings of the 1st international Symposium on Nitrogen Fixation**, 1976. p. 518-538.

EL ZEMRANY, H. E.; CORTET, J.; LUTZ, M. P.; CHABERT, A.; BAUDOIN, E.; HAURAT, J.; MAUGHAN, N.; FÉLIX, D.; DÉFAGO, G.; BALLY, R.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1712-1726, 2006.

EL ZEMRANY, H. E.; CZARNES, S.; HALLETT, P. D.; ALAMERCERY, S.; BALLY, R.; MONROZIER, L. J. Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. **Plant and Soil**, v. 291, p. 109-118, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA, **Manual de métodos de análises de solo**. Rio de Janeiro EMBRAPA-CNPQ, 1997. 212 p.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FONTANÉTTI, A.; CARVALHO, G. J.; MORAIS, A. R.; ALMEIDA, K.; DUARTE, W. F. Adubação verde no controle de plantas invasoras nas culturas de alface-americana e de repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 967-973, 2004.

FORNARI, E. **Manual prático de agroecologia**. São Paulo, Aquariana, 2002. 241 p.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, p. 35-59, 2009.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145-150, 1993.

FYFE, W.S.; LEONARDOS, O.H.; THEODORO, S.H. Sustainable farming with native rocks: the transition without revolution. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 715-720, 2006.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: Universidade, UFRGS, 2000. 653 p.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

HINSINGER, P., BARROS, O. N. F., BENEDETTI, M. F., NOACK, Y.; CALLOT, G. Plant-induced weathering of a basaltic rock: Experimental evidence. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 65, n. 1, p. 137-152. 2001.

HOLT, J. G.; KREIG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 1994.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

INFORMAÇÕES DO BRASIL. Disponível em:
<<http://www.informacoesdobrasil.com.br/>>. Acesso em: 29 de novembro de 2012.

JHA, B.; THAKUR, M. C.; GONTIA, I.; ALBRECHT, V.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 62-72, 2009.

JORGE, L. A. C.; RODRIGUES, A. F. O. **Safira: sistema de análise de fibras e raízes**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/31890>>

KARKI, L.; SCHLEENBECKER, R.; HAMM, U. Factors influencing a conversion to organic farming in Nepalese tea farms. **Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics**. v. 112, n. 2, 113-123, 2011.

KELEMAN, A.; HELLIN, J.; BELLON, M. R. Maize diversity, rural development policy, and farmers practices: lessons from Chiapas, Mexico. **The Geographical Journal**, v. 175, n. 1, p. 52-70, 2009.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido intolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1459-1465, 2007.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.

LEONARDOS, O.H.; FYFE, W.S.; KRONBERG, B. I. The use of ground rocks in laterite systems: An improvement to the use of conventional soluble fertilizers? **Chemical Geology**, v. 60, p. 361-370, 1987.

LIN, S.; SHEN, F.; YOUNG, L.; ZHU, Z.; CHEN, W.; YOUNG, C. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1185-1190, 2012.

MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R. **Estresse Ambiental: o milho em perspectiva**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1991. 47 p.

MACHADO, A. T.; MACHADO, C. T. T.; FURLANI, P. R. Avaliação e caracterização de variedades locais de milho para condições adversas de ambiente. In: SOARES, A.C.; MACHADO, A.T.; SILVA, B. M.; VON DER WEID, J.M. (eds). **Milho Crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rede Projetos Tecnologias Alternativas, Rio de Janeiro, 1998. p.151-178.

MACHADO, C.T.T.; FURLANI, A. M. C.; MACHADO, A.T. Índices de eficiência de variedades locais e melhoradas de milho ao fósforo. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 3, p. 225-238, 2001.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. New Jersey, Princeton University Press, Princeton. 1988, 179p.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R. S. A., MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 85-93, 2004.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the *16S rRNA* gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.

MIYAUCHI, M.Y.H.; LIMA, D.S.; NOGUEIRA, M.A.; LOVATO, G.M.; MURATE, L.S.; CRUZ, M.F.; FERREIRA, J.M.; ZANGARO, W.; ANDRADE, G. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 525-531, 2008.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21-28, 2012.

MYERS, R.J.K.; van NOORDWIJK, M.; VITYAKON, P. Synchrony of nutrient release and plant demand: Plant litter quality, soil environment and farmer management options. In: CADISCH, G.; GILLER, K.E. (orgs). **Driven by nature: Plant litter quality and decomposition**. Wallingford, CAB International, 1997. p.215-229.

ODHIAMBO, J. J. O.; OGOLA, J. B. O.; MADZIVHANDILA, T. Effect of green manure legume - maize rotation on maize grain yield and weed infestation levels. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 8, p. 618-625, 2010.

OLIVEIRA, F.L.; GUERRA, J.G.M.; JUNQUEIRA, R.M.; SILVA, E.E.; OLIVEIRA, F.F.; ESPINDOLA, J.A.A.; ALMEIDA, D.L.; RIBEIRO, R.L.D.; URQUIAGA, S. Crescimento e produtividade do inhame cultivado entre faixas de guandu em sistema orgânico. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 53-58, 2006.

PARK, M.; KIM, C.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, S.; SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, v. 160, p. 127-133, 2005.

PARKE, J. L.; GURIAM-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 225-258, 2001.

RAMOS, H. J. O.; RONCATO-MACCARI, L. D. B.; SOUZA, E. M.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; HUNGRIA, M.; PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology**, v.97, p. 243-252, 2002.

REINERT, D. J.; ALBUQUERQUE, J. A.; REICHERT, J. M.; AITA, C.; ANDRADA, M. M. C. Limites críticos de densidade do solo para o crescimento de raízes de plantas de cobertura em argissolo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1805-1816, 2008.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potencial applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, v. 287, p. 15-21, 2006.

ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, v. 302, p. 91-104, 2008.

RÖMHELD, V. Different strategies for iron acquisition in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 70, p. 231-234, 1987.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, 2007.

SAMORA, R. 2012. **Petrobras vê espaço para novas unidades de fertilizantes no país**. Disponível em: <<http://br.reuters.com/article/businessNews/idBRSPE87004O20120801>>. Acesso em: 26 de setembro de 2012.

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

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.

SHIVAY, Y. S.; KROGSTAD, T.; SINGH, B. R. Mineralization of copper, manganese and zinc from rock mineral flour and city waste compost for efficient use in organic farming. **Plant and Soil**, v. 326, p. 425-435, 2010.

SHU, W.; PABLO, G. P.; JUN, Y.; DANFENG, H. Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 493-503, 2012.

SILVA, A. A.; SILVA, P. R. F.; SUHRE, E.; ARGENTA, G.; STRIEDERI, M. L.; RAMBO, L. Sistemas de coberturas de solo no inverno e seus efeitos sobre o rendimento de grãos do milho em sucessão. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.928-935, 2007.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973.

SOOD, S. G. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 219-227, 2003.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 425-448, 2007.

SPAEPEN, S.; DOBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v. 312, p. 15-23, 2008.

StatSoft, Inc. **STATISTICA** (data analysis software system), version 7, 2004.
Disponível em: <www.statsoft.com>.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487-506, 2000.

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

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen nov and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov and *Azospirillum brasilense* sp nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967-980, 1978.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HAKAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em

três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 43-49, 2007.

THEODORO, S. H.; LEONARDOS, O. H. The use of rocks to improve family agriculture in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 721-730, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Documento 234, ISSN 1517-8498, 2007. 74p.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WILLER, H. Organic Agriculture Worldwide – the Results of the FiBL/IFOAM Survey. In: WILLER, H.; KILCHER, L. (eds.), **The World of Organic Agriculture**. Statistics and Emerging Trends 2011. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), Bonn, 2011. 234 p.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**. v. 173, p. 2271-2277, 1991.