



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MILENA PUPO RAIMAM

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS DE VIDA – LIVRE E FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR (GLOMUS CLARUM) EM
ARROZ (ORYZA SATIVA)**

Londrina
2004

MILENA PUPO RAIMAM

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS DE VIDA – LIVRE E FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR (GLOMUS CLARUM) EM
ARROZ (ORYZA SATIVA)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade

Londrina
2004

MILENA PUPO RAIMAM

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS DE VIDA – LIVRE E FUNGO
MICORRÍZICO ARBUSCULAR (GLOMUS CLARUM) EM
ARROZ (ORYZA SATIVA)**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Ulisses Brigatto Albino
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Waldemar Zangaro
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 15 de dezembro de 2004.

*“O papel dos infinitamente pequenos
é infinitamente grande”*

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Ao grandioso Deus, por me fazer perseverante todos os dias, mesmo quando quis fraquejar;

À minha maravilhosa família, que mesmo distante me apoiou em todos os sentidos, me confortando quando a saudade foi maior do que tudo. Amo muito vocês;

Ao meu orientador, Dr. Galdino Andrade, "Gal", que permitiu que eu fizesse parte de sua equipe e alcançasse este objetivo;

A toda equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana, com quem vivi momentos que guardarei eternamente na memória;

Ao prof. Dr. Marco Antonio Nogueira pela amizade e grande participação neste trabalho, principalmente na execução dos testes estatísticos;

Ao grande amigo Márcio Cruz pela grande amizade e disposição em todos os momentos;

Ao meu namorado Ulisses por todo amor, apoio e discussões na elaboração deste trabalho;

Às minhas grandes amigas Vilma, Adri e Sil que hoje vibram comigo mais esta conquista.

Muito Obrigado.

RAIMAM, Milena Pupo. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas de vida-livre e fungo micorrízico arbuscular (*glomus clarum*) em arroz (*Oryza sativa*).** 2004. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2004.

RESUMO

O arroz é cultivado normalmente em solos deficientes em nitrogênio, exigindo que este elemento seja acrescentado à cultura através de fertilizantes nitrogenados a base de uréia e nitrato, causando problemas de poluição ambiental. A utilização da tecnologia da fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode diminuir a aplicação destes fertilizantes, reduzindo riscos ambientais. Este estudo avaliou os efeitos de quatro gêneros de bactérias fixadoras de N, isoladas da planta carnívora *Drosera villosa* var. *villosa*, encontrada em solos oligotróficos, e sua interação com fungo micorrízico arbuscular (*Glomus clarum*), sobre o desenvolvimento de arroz cultivado nos sistemas de sequeiro e irrigado, em casa de vegetação. Na condição de sequeiro foram testadas as cepas *Methylobacterium* sp., *Burkholderia* sp. e *Sphingomonas* sp., e na condição irrigado foram inoculadas as cepas *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas* sp. As cepas foram inoculadas isoladas e na forma de pool, com ou sem *G. clarum*. Os experimentos foram realizados em blocos casualizados, com cinco repetições. A presença de *G. clarum* diminuiu ou não afetou o crescimento da planta nas duas condições de cultivo. Por outro lado, o fungo estimulou a população de bactérias fixadoras de N na condição de sequeiro. Os gêneros de bactérias tiveram diferentes efeitos sob as duas condições de cultivo. Alguns gêneros aumentaram o crescimento de raiz e parte aérea em diferentes estágios de crescimento da planta em relação aos controles.

Palavras-chaves: Micorriza arbuscular. Arroz. *Glomus*. Fixação de nitrogênio. Promoção do crescimento. Rizosfera.

ABSTRACT

Rice is usually grown in N-deficient soils, demanding that the element be supplied to the field by commercially available N fertilizers. Unfortunately, a substantial amount of the urea-N or NO₃-N applied as fertilizers is lost through different mechanisms, causing environmental pollution problems. Utilization of biological N₂ fixation (BNF) technology can decrease the application of N fertilizers, reducing environmental risks. This study evaluated the effects of four free-living N-fixing bacterial genera, isolated from the carnivorous plants, *Drosera villosa* var. *villosa*, from oligotrophic soil conditions, as single inoculants or combined with arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus clarum*), on the development of rice plants grown as flooded or upland rice, in the greenhouse. Upland rice roots were inoculated with *Methylobacterium* sp., *Burkholderia* sp. and *Sphingomonas* sp., whereas the species *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. and *Sphingomonas* sp. were inoculated on flooded rice. Inoculants consisted of individual bacterial genera or their mixtures, with or without *G. clarum*. Experiments were carried out in five replicates. The presence of *G. clarum* decreased or did not significantly affect plant growth under the different culture conditions. The presence of AM fungi stimulated the N-fixing bacterial population of upland rice. Bacterial species had different effects, under both culture conditions, and some genera of N-fixing bacteria increased root and shoot growth at different plant growth stages.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza. Rice. *Glomus*. Nitrogen fixation. Growth promotion. Rhizosphere.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 A RIZOSFERA	11
3.2 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL	13
3.3 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES	15
3.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	17
3.5 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO DE CEREAIS	18
3.6 PLANTAS CARNÍVORAS E MICRORGANISMOS	23
REFERÊNCIAS	23
ARTIGO: Interaction among free living N bactéria fixing isolated from <i>Drosera villosa</i> var. <i>villosa</i> and AM fungi (<i>Glomus clarum</i>) in rice (<i>Oryza Sativa</i>).....	31

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de compatibilizar a produção agrícola e conservação ambiental tem realçado a importância da Microbiologia do Solo nas últimas décadas. Atualmente, o interesse pelos microrganismos do solo tem aumentado, pois são, em grande parte, os responsáveis pela conservação, fertilidade do solo e nutrição da planta. A biotecnologia tem avançado na seleção de microrganismos mais eficientes e adaptados às diversas condições, bem como na melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas "funções" executadas por estes.

Considera-se como agricultura sustentável àquela baseada na utilização racional dos recursos naturais, visando atender às necessidades das gerações presentes e futuras, utilizando processos biológicos para ciclagem de nutrientes e controle natural de pragas e doenças. Estes processos são em sua maioria mediados e dependentes da ação de microrganismos, daí a grande importância do estudo da diversidade microbiana, tanto nos ecossistemas naturais como nos agroecossistemas.

Os microrganismos decompõem ativamente a matéria orgânica, liberando nutrientes e energia, produzem substâncias que auxiliam na agregação do solo, estimulam o crescimento vegetal, além de incorporar nutrientes, como o nitrogênio, através do processo da fixação biológica.

Entre todas estas atividades desempenhadas por microrganismos, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) talvez seja o processo microbiano relacionado à agricultura mais bem estudado e explorado tecnologicamente. Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações de fertilizantes nitrogenados leva a uma melhoria da qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para as águas superficiais e subterrâneas. A maximização das contribuições da FBN nos agroecossistemas tornou-se, então, parte dos esforços de pesquisa visando a sustentabilidade das produções agrícolas.

Outro processo biológico com grande potencial para a agricultura é a disponibilização de nutrientes às plantas, promovida por fungos que se associam às raízes, denominados fungos micorrízicos, promovendo vantagens nutricionais à planta hospedeira.

Nas últimas décadas, têm se multiplicado as evidências do efeito benéfico destas associações com diversas plantas superiores de importância econômica, já que além de maximizar a utilização de fósforo disponível no solo, contribui para a redução de danos causados por patógenos, assim como a diminuição de estresses ambientais. Entretanto, para sua plena exploração é necessário conhecer melhor alguns aspectos desta associação. Apesar de existir uma gama de conhecimentos nesta área, ainda assim são necessários estudos para a melhor compreensão dos processos envolvendo microrganismos, os quais ocorrem simultaneamente no ambiente, refletindo diretamente no desenvolvimento da planta.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera de plantas carnívoras *Drosera villosa* var. *villosa*, bem como a interação com fungo micorrízico arbuscular (MA) *Glomus clarum*, na cultura de arroz (*Oryza sativa* var. EPAGRI 108) nas condições de sequeiro e irrigado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a capacidade das bactérias fixadoras de N em colonizar a rizosfera e endorrizosfera das plantas objeto de estudo;
2. Avaliar a efetividade das bactérias fixadoras de N no crescimento das plantas;
3. Avaliar a curva de sobrevivência das bactérias fixadoras de N na rizosfera das plantas estudadas;
4. Avaliar a influência dos fungos do tipo micorriza arbuscular na efetividade das cepas fixadoras de N;
5. Selecionar as cepas mais eficientes para cada condição de cultivo para futuros experimentos em nível de campo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A RIZOSFERA

O solo representa o ambiente com maior concentração de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, algas e protozoários. Estima-se que 1g de solo contenha mais de 104 espécies (Giller *et al.*, 1997). Entretanto sabe-se que ocorrem regiões no solo onde a presença e atividade microbiana são mais intensas, como é o caso da região denominada rizosfera. Este termo foi utilizado pela primeira vez por Hiltner (1904) e definido posteriormente por Paul e Clark (1989) como a região do solo que recebe influência imediata das raízes, e na qual ocorre intensa proliferação de microrganismos.

A rizosfera pode ser considerada sob 3 regiões: (1) o rizoplano, o qual inclui a epiderme e o mucigel (material gelatinoso da superfície radical, composto por produtos metabólicos, células microbianas, matéria orgânica e minerais); (2) a endorrizosfera, composta pelos tecidos da raiz, os quais podem estar colonizados por microrganismos; (3) o solo rizosférico, interface solo-raiz (Walker *et al.*, 2003).

A rizosfera é relativamente rica em nutrientes liberados pelas raízes, os exudatos, que favorecem a atividade metabólica das populações microbianas, que por sua vez, diferem da microbiota estabelecida em locais sem a influência das raízes. À medida que a distância da rizosfera diminui, aumenta a concentração de microrganismos de vários grupos, como bactérias, actinomicetos e fungos.

Os exudatos são compostos por moléculas de baixo e alto peso molecular. Os de baixo peso molecular compreendem os aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e vários outros metabólitos secundários e os exudatos de alto peso molecular incluem primariamente mucilagem e proteínas (Walker *et al.*, 2003).

Vários estudos sugerem que os exudatos atuam como mensageiros, os quais comunicam e iniciam os processos biológicos e físicos das interações entre raízes e organismos do solo, como por exemplo, os flavonóides presentes nos exudatos de leguminosas que ativam os genes de *Rhizobium meliloti* responsáveis pelo processo de nodulação (Peters *et al.*, 1986), sugerindo que a população

rizosférica interfere diretamente no padrão de exudação, alterando a quantidade e qualidade dos exudatos.

Sendo a rizosfera um ambiente altamente diversificado em termos de microrganismos colonizadores, vários tipos de interações podem ocorrer. Estas interações podem ter caráter antagônico, competitivo ou sinérgico, podendo este ser de efeito positivo ou negativo, ocorrendo no solo rizosférico e no rizoplane (Andrade, 1999). Estas interações estão sob influência, entre outros fatores, das características do tipo de solo, da cobertura vegetal e da composição química dos exudatos liberados pela planta, os quais agem diretamente sobre a comunidade microbiana e sua atividade, de forma atrativa ou repulsiva (Yang e Crowley, 2000). Ainda, estas interações apresentam características quantitativas e qualitativas na sua composição, atuando inúmeras vezes como bioindicadores de distúrbios ambientais, porém sabe-se que determinada condição ambiental pode afetar a atividade microbiana, sem afetar a biodiversidade da comunidade (Brasil, 2003).

Na relação solo-planta, a aquisição de nutrientes pode ser diretamente afetada pela composição da biota e sua presença ou não na rizosfera. Os efeitos podem ser benéficos (modificação morfológica das raízes, favorecendo a captação de nutrientes, a decomposição e mineralização da matéria orgânica, a fixação biológica de N, a produção de enzimas, vitaminas, etc.) ou maléficos (imobilização e/ou competição por nutrientes, etc.). Os microrganismos rizosféricos podem aumentar ou diminuir o crescimento das raízes, a formação dos pêlos radiculares e a disponibilidade espacial de nutrientes (Marschner, 1998). O estado nutricional e a produtividade da planta estão fortemente relacionados com a comunidade microbiana estabelecida na rizosfera.

Mesmo sendo diversas e complexas, a maioria das interações na rizosfera resultam em benefícios mútuos para as plantas e para os microrganismos. A melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nestas interações permitirá maiores avanços na utilização deste recurso, melhorando as práticas agrícolas.

3.2 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Como visto anteriormente, os efeitos da interação planta-microrganismo sobre o crescimento da planta podem ser positivos, negativos ou neutros. Todas as bactérias que influenciam positivamente, através de algum mecanismo este crescimento, são denominadas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR), as quais compõem um grupo bastante amplo de bactérias do solo que crescem em associação com a planta hospedeira, sob a influência das raízes (Vessey, 2003).

Durante as últimas décadas, o uso de PGPR pela agricultura sustentável tem aumentado expressivamente em várias partes do mundo, com aumentos significativos de produtividade de importantes culturas (Chen *et al.*, 1994; Asghar *et al.*, 2002). A relação entre uma PGPR e seu hospedeiro pode-se dar de duas formas, rizosférica ou endofítica. Na primeira, há a colonização da rizosfera, da superfície das raízes ou ainda dos espaços intercelulares superficiais e esta interação pode ser afetada diretamente por variações de pH do solo, potencial de água, pressão de O₂ e várias mudanças físicas e químicas resultantes da exudação das plantas (Griffiths *et al.*, 1999). Na relação do tipo endofítica ocorre a colonização dos espaços apoplásticos e raramente espaços intracelulares. Este tipo de relação pode ser exemplificada através das simbioses rizobio-leguminosa, *Parasponia-rhizobio*, *Azolla-Anabaena*. A entrada do endófito pode ocorrer através das aberturas naturais (estômatos, pontos de emergência de raízes laterais), por atividade de celulases e pectinases ou mesmo através de vetores, como ocorre com *Saccharicoccus saccharis* e fungo micorrízico arbuscular (Franke *et al.*, 2000).

Os modos de atuação destas rizobactérias são vários, pode ser de forma indireta como a inibição de patógenos do solo, realizando o controle biológico, estratégia bastante visada atualmente (Baker, 1968; Schippers *et al.*, 1987; Chet *et al.*, 1991; Whipps, 2001), ou de forma direta com a produção de fitormônios que estimulam o crescimento da planta (Barazani e Friedman, 1999), afetando o padrão das raízes, resultando em raízes maiores, com maior área de superfície de absorção e exploração do solo, e conseqüente aproveitamento dos nutrientes disponíveis. Entre os fitormônios, o ácido indol acético (AIA) é o mais encontrado sendo produzido por estas bactérias, estima-se que 80% das bactérias isoladas da

rizosfera podem produzir AIA (Vessey, 2003). Há relatos da produção deste fitormônio por *Enterobacter sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Azospirillum brasilense*; *Pseudomonas syringae*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, etc (Dobbelaere *et al.*, 2003). Ainda de forma direta, estas bactérias podem atuar no aumento da disponibilidade de nutrientes no solo, solubilizando formas indisponíveis.

A solubilização de P é extremamente importante para o crescimento da planta visto que a quantidade deste elemento disponível é pequena. Calcula-se que os microrganismos solubilizadores de P constituem 20 a 40% da população cultivável de microrganismos do solo (Chabot *et al.*, 1996). Ainda pode haver a produção de sideróforos que facilitam o transporte de certos nutrientes para a planta (Paulitz e Linderman, 1989; Bevivino *et al.*, 1998).

A fixação biológica de nitrogênio por este grupo de bactérias (PGPR), tanto em leguminosas (Gualtieri e Bisseling, 2000; Sessitsch *et al.*, 2002) como em não leguminosas é bastante explorada (Baldani *et al.*, 1997; Riggs *et al.*, 2001, Dobbelaere *et al.*, 2003). Entretanto muitos experimentos demonstram a pequena contribuição da FBN no crescimento da planta por este grupo de bactérias. Geralmente as respostas no crescimento estão relacionadas com outros modos de ação destas bactérias, atuando de forma sinérgica. Por outro lado, como não existem estruturas diferenciadas no sistema radicular nas interações do tipo associativas, e uma grande diversidade de PGPR pode ser isolada da rizosfera de uma única planta, é praticamente impossível determinar quais organismos são responsáveis pela promoção do crescimento da planta ou fixação de N₂.

A elucidação dos diferentes mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal, através de técnicas que permitam avaliar a contribuição individual de cada microrganismo ou processo e utilizar este recurso, tanto para a economia, nos sistemas agrícolas, como para a preservação ambiental e recuperação de áreas degradadas.

3.3 FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR

Ao longo da evolução, os microrganismos adquiriram características e adaptabilidades para coexistência com diferentes seres vivos, estabelecendo relações diversas em forma e função. Dentre as inúmeras relações biológicas, destacam-se as simbioses entre plantas e microrganismos heterotróficos, como as micorrizas, que são associações entre fungos e raízes, as quais representam uma importante influência sobre a fertilidade do solo e saúde das plantas (Johansson e Paul, 2004).

Os fungos micorrízicos compõem um importante grupo de simbiontes mutualísticos. Esta associação pode ser encontrada em quase todas as situações ecológicas, e a grande maioria das plantas forma esta simbiose naturalmente, sendo mais comum listar as exceções. O tipo de associação mais comumente encontrada é a micorriza arbuscular (MA), assim denominada em função da formação de estruturas altamente ramificadas intracelularmente, os arbúsculos, que são o local de troca de nutrientes entre o fungo e a planta. Vesículas contendo lipídios, caracterizando estruturas de armazenamento ocorrem em alguns casos (Hodge, 2000).

Os fungos MA aumentam a disponibilidade de minerais para as plantas, melhorando seu estado nutricional, substituindo em parte os fertilizantes fosfatados e aumentando a eficiência das adubações (Vázquez *et al.*, 2000). O efeito sobre o crescimento da planta é grande em solos com baixa disponibilidade de P (Koide, 1991; Gryndler *et al.*, 1995). Também contribuem para a conservação de nutrientes, manutenção e funcionamento de ecossistemas. Sabe-se também que plantas micorrizadas inibem mais eficientemente patógenos do solo (Mansfeld-Giese *et al.*, 2002).

O estabelecimento desta simbiose pode afetar a comunidade bacteriana. Andrade *et al.*, (1998b) constataram diferenças significativas na composição bacteriana, influenciada pela presença de fungos MA entre regiões distintas da rizosfera de uma mesma planta. Estudos indicam que a colonização micorrízica difere no seu efeito sobre a composição da comunidade da rizosfera e isto pode ser explicado por mudanças na exudação das raízes e no metabolismo de carboidratos da planta (Marschner e Baumann, 2003). Meyer e Linderman (1986)

constatarem a influência de *Glomus fasciculatum* sobre o número de bactérias na rizosfera de trevo e milho e encontraram uma diminuição na densidade bacteriana (unidades formadoras de colônias) na rizosfera das duas espécies após a colonização micorrízica. Por outro lado, o crescimento da comunidade bacteriana em plantas micorrizadas também ocorre (Söderberg *et al.*, 2002). Alterações como estas, promovidas pela presença dos fungos MA, compõem o *efeito micorrizosférico* (Barea *et al.*, 2002).

Em contrapartida, as rizobactérias podem estimular ou inibir o estabelecimento da simbiose (Andrade *et al.*, 1998a; Andrade, 2004). O conceito elaborado por Garbaye (1994), denominando *bactérias helper*, os agentes microbianos específicos com habilidade para estimular a germinação e o crescimento de fungos micorrízicos tem sido documentado freqüentemente. Vários mecanismos pelos quais as bactérias aumentam a micorrização têm sido propostos, dentre eles a produção de compostos que aumentam a permeabilidade da raiz, estimulação da hifa infectiva, instalação da biotrofia, etc. Budi *et al.* (1999) isolaram bactérias do gênero *Paenibacillus*, antagonistas de vários patógenos do solo e potentes estimuladoras da colonização micorrízica da rizosfera de sorgo. Mayo *et al.* (1986 apud Xavier e Germida, 2003) demonstraram que esporos de *Glomus vesiforme* germinaram menos quando foram esterilizados superficialmente. O isolamento de bactérias dos esporos mostrou que vários gêneros, incluindo *Pseudomonas* e *Corynebacterium*, aumentaram a germinação dos esporos. Em contrapartida, efeitos negativos sobre a germinação do esporo e crescimento micelial no solo também estão registrados (Gryndler *et al.*, 1995; Hodge, 2000).

Sinergismo entre fungo MA e bactérias rizosféricas ocorrem muitas vezes (Andrade *et al.*, 1998a). Isopi *et al.*, (1995) avaliaram o efeito de fungos MA e *Gluconacetobacter diazotrophicus* em plantas de sorgo. Mesmo as bactérias tendo diminuído a porcentagem de colonização de fungos nas raízes e os fungos aumentando a infecção por diazotróficos nas raízes, colmos e folhas, o teor de N aumentou nas plantas inoculadas com ambos microrganismos, os quais também interferiram no tamanho das raízes, que se tornaram mais compridas e ramificadas. As causas deste sinergismo parecem estar mais associadas com a produção de fitormônios do que a fixação de nitrogênio por estes microrganismos (Bagyaraj, 1984).

A possibilidade de infectar plântulas com diazotróficos endofíticos via fungos micorrízicos arbusculares representa uma oportunidade ímpar para introdução de bactérias selecionadas ou melhoradas geneticamente nas plantas, estabelecendo relação benéfica entre os microrganismos e a planta (Döbereiner, 1992). Neste contexto, Paula *et al.* (1991) demonstraram em cana-de-açúcar, batata doce e sorgo a infecção por *G. diazotrophicus* quando co-inoculado com *G. clarum*. Com a inoculação de ambos microrganismos, o número de diazotróficos dentro das raízes esterilizadas superficialmente foi significativamente maior quando comparado aos tratamentos em que não houve inoculação ou somente inoculação do diazotrófico. Claramente, bactérias rizosféricas desempenham vários efeitos sobre fungos MA e vice-versa. O principal desafio é determinar quais destes efeitos demonstrados em condições de laboratório podem ser reproduzidos no campo.

3.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é encontrado na natureza na forma molecular (N_2), íons nitrato (NO_3), amônia (NH_3) ou incorporado em compostos orgânicos, fazendo parte da estrutura de ácidos nucléicos (DNA e RNA) e aminoácidos formadores das proteínas. Entretanto organismos eucariontes são incapazes de absorver o N atmosférico e convertê-lo a uma forma assimilável. Para que isto ocorra é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial) ou a presença de um sistema enzimático apropriado, o qual propicia o processo denominado Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Este fenômeno é crucial para a manutenção da vida na Terra, realizado apenas por um grupo de procariotos, denominados diazotróficos, e a sua contribuição para o balanço global do N é estimado entre 100 e 200 milhões de toneladas de N fixado ao ano (Galloway *et al.*, 1995).

Estes organismos podem ser autotróficos ou heterotróficos, sendo encontrados na natureza isolados ou associados a plantas. Nestas associações o microrganismo pode estar livre na rizosfera ou intimamente ligado à planta como nas simbioses rizobioleguminosa.

A descoberta de que os diazotróficos endofíticos *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. podem contribuir para o crescimento de cana-de-açúcar via FBN, sem a formação de estruturas especializadas (Boddey *et al.*, 1995), desencadeou a busca por interações estáveis entre diazotróficos e plantas não leguminosas. Esta fonte de N passou a ser valorizada com a crise do petróleo, a qual acarretou altas nos custos dos fertilizantes nitrogenados. O processo de FBN assumiu grande importância na manutenção da economia de países potencialmente agrícolas (Albino, 2004). Os fertilizantes químicos, por conseguinte, são demais caros, custando para a agricultura mais de 45 bilhões de dólares por ano (Ladha e Reddy, 2003). A utilização de fertilizantes sintéticos, além de cara, gera resíduos prejudiciais ao ambiente. A possibilidade da substituição do uso destes produtos pelo processo natural de obtenção de N traz muitas vantagens econômicas e ambientais.

No Brasil, como na maioria dos países tropicais, a baixa disponibilidade de nitrogênio dos solos é responsável, em grande parte, pelos baixos níveis de rendimento das culturas. Esta situação é crítica, principalmente nas áreas ocupadas por pequenos agricultores que, por razões econômicas, não têm acesso ao consumo de adubos nitrogenados. Nesta situação, somente as culturas que possuem um sistema de FBN eficiente, como certas leguminosas (feijão, soja, caupi, etc.) podem produzir adequadamente sem a aplicação destes adubos. A possibilidade de extensão da FBN para não-leguminosas, como os cereais, acarretará um menor custo de produção para estas culturas.

3.5 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CEREAIS

Os cereais são responsáveis pela base da alimentação humana, consumidos especialmente pela população de baixa renda. Dados revelam que 60% da alimentação mundial consistem em arroz, trigo e milho, sendo o arroz responsável por 40% deste total, resultando no mais importante grão constantemente produzido (USDA 1995). Segundo dados levantados pelo IRRI (*International Rice Research Institute*), a cultura do arroz consome 10 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados anualmente, em todo o mundo, e com o

aumento da procura pelo grão, estima-se que esta quantia deva ser duplicada nos próximos vinte anos.

Até 1950 somente *Azotobacter* e *Clostridium lipoferrum* estavam caracterizados como fixadores de N de vida livre, e somente *Azotobacter* havia sido testado como inoculante em cereais (González-López, 1992). Dobereiner (1961) descreveu o gênero *Beijerinckia* como fixador de N não simbiótico, isolado do rizoplane de cana-de-açúcar. Posteriormente, o isolamento de vários diazotróficos de vida livre, entre eles representantes do gênero *Azospirillum*, foi possível através de modificações de meios de cultivos, alterando as fontes de carbono.

Em 1992, a idéia proposta pela Dra. Johanna Dobereiner, de que bactérias diazotróficas podiam colonizar internamente todos os tecidos de cana-de-açúcar sem apresentar sinais de doenças, passando a denominá-las endofíticas, proporcionou um grande impulso para a Microbiologia Agrícola.

Mesmo que ainda apenas uma pequena parte das necessidades de N possa ser suprida pela FBN nos cereais, são vantajosos os investimentos nesta área, considerando-se a quantidade de fertilizantes utilizados e a área plantada, a qual ocupa 2/3 das terras cultivadas com produção total de aproximadamente 2 x 10⁹ t/ano (Sala, 2002).

O cultivo de arroz ocupa 155 milhões de hectares em todo o mundo, e a produção atinge cerca de 600 milhões de toneladas ao ano. O sistema inundado corresponde a 55% da área cultivada e contribui com 75% da produção total (Fairhurst e Dobermann, 2002).

No Brasil, a importância econômica da lavoura orizícola é bastante significativa, e representou 10,7% da produção nacional de grãos em 2003. Nesta mesma safra, a produção atingiu 12 milhões de toneladas com recorde na área plantada de 3,6 milhões de hectares (CONAB, 2004).

A utilização de fertilizantes nitrogenados varia de acordo com o sistema de cultivo e cultivar em uso. Em geral são recomendados 60 a 120 Kg N ha⁻¹ para arroz na condição de sequeiro e menos de 10 até 90 Kg N ha⁻¹ para arroz inundado (IRRI 1996).

Quantidades elevadas de N provenientes da FBN são demonstradas em arroz (Roger e Ladha, 1992; Ladha *et al.*, 1997; Shenoy *et al.*, 2001). A contribuição deste processo pode alcançar 75 Kg N ha⁻¹ por ciclo da cultura, com médias variando de 8 a 30 Kg N ha⁻¹ (Irisarri *et al.*, 2001).

Existe uma grande diversidade de bactérias diazotróficas já conhecidas, encontradas associadas com plantas de arroz, incluindo espécies pertencentes a vários gêneros como *Klebsiela*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, isoladas a partir do rizoplano, rizosfera, interior de raízes, colmos e folhas de arroz.

A inoculação de *Azospirillum lipoferum* em plantas de arroz cultivadas em ambiente com baixo conteúdo de matéria orgânica e pouco N no solo demonstrou que 70% do nitrogênio era proveniente da atmosfera (Baldani *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 2000). Malik *et al.* (1997) demonstraram que mais de 30% do N total acumulado em plantas e arroz inoculadas com *Azospirillum* sp. era derivado da FBN. Baldani *et al.* (2000) inocularam plantas de arroz com linhagens de *H. seropedicae* e *Burkholderia* spp. E embora os níveis de N na planta, derivados da FBN, serem baixos, houve um aumento do conteúdo de nitrogênio nos grãos das plantas inoculadas. Em muitos casos os efeitos positivos observados com a inoculação de bactérias diazotróficas, como o *Azospirillum* spp. são atribuídos à produção de fitormônios ou um aumento na assimilação de NO₃ estimulada por certas linhagens (Baldani *et al.*, 2000).

A FBN parece estar intimamente ligada ao genótipo da planta. Boddey *et al.* (1995) estimaram a contribuição do processo em 15 diferentes variedades de arroz cultivadas em tanques com solo contendo ¹⁵N. Os autores sugerem que determinadas variedades podem obter mais de 30% de seu N da FBN. Shrestha e Ladha (1996) realizaram experimento comparando 70 genótipos de arroz e verificaram que a quantidade de N derivada da atmosfera variou de 0 a 20,2% em alguns genótipos e em outros de 16 a 70 Kg de N ha⁻¹ por cultivo foram fixados.

A interação entre diazotróficos rizosféricos e/ou endofíticos com arroz é promissora, principalmente em variedades primitivas que não respondem eficientemente à adubação química. Estas variedades, quando cultivadas em locais úmidos são freqüentemente colonizadas por bactérias endofíticas. No entanto, há pouca informação sobre a habilidade destes microrganismos em fixar N nesta condição. Verma e Ladha (2001) investigaram a diversidade deste grupo de bactérias em sementes de uma tradicional variedade de arroz inundado e obtiveram sete diferentes genótipos. Verificaram que uma linhagem isolada de sementes que foram esterilizadas superficialmente bem como da parte aérea da planta,

apresentava atividade de redução de acetileno relativamente alta e foi identificada como *Pantoea agglomerans*, porém esta técnica mensura a atividade da nitrogenase e não a incorporação do N fixado na planta.

Outro problema encontrado no cultivo de arroz irrigado com relação aos fertilizantes nitrogenados é a possível contaminação do ambiente. Apenas 1/3 do nitrogênio aplicado é utilizado pela cultura, o restante tem implicado na contaminação de reservatórios de água por nitrato. Ainda, o excesso de N pode levar à produção de óxido nitroso contribuindo para o aquecimento global, pois este gás é eficiente em absorver radiação infravermelha e permanecer muito tempo na atmosfera.

3.6 PLANTAS CARNÍVORAS E MICRORGANISMOS

As plantas carnívoras são assim denominadas por deterem a capacidade de atrair, capturar, digerir e utilizar as substâncias úteis de suas presas, que podem ser insetos, moluscos, minhocas entre outros, para seu próprio benefício além de realizar o processo de fotossíntese, comum aos vegetais. São vegetais altamente especializados, apresentando características anatômicas, fisiológicas e ecológicas singulares, vivendo em ambiente de baixa variação.

Adamec (2002) afirma que a carnivoría se desenvolveu em várias etapas durante a evolução das plantas, sendo mais uma das várias estratégias de adaptação a condições desfavoráveis. Dentre as características ecológicas comuns a todas as plantas carnívoras pode-se citar a tolerância a ambientes pobres em nutrientes, intolerância à competição, intolerância à sombra ou baixa luminosidade e a tolerância a alagamentos temporários ou permanentes (Saridakis, 2003).

O gênero *Drosera* L., pertence à família Droseraceae, é cosmopolita, com mais de 100 espécies, das quais 16 são encontradas no Brasil. No Estado do Paraná, ocorre em regiões de altitudes elevadas, expostas ao sol, umidade constante, baixa temperatura e em solos distróficos e ácidos (Saridakis *et al.*, 2004).

Piliakas e Barbosa (1989) afirmam que a digestão parcial ou total das presas é facilitada através da simbiose de algumas bactérias com a planta, sugerindo assim um modo de atuação de microrganismos neste grupo vegetal.

Segundo Piliackas (1998), a pobreza nutricional e acidez dos solos onde se desenvolvem as plantas carnívoras impedem a atuação de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, assim estas bactérias se associam com as plantas, obtendo vantagens mútuas.

Experimentos feitos por Wagner e Mshigeni (1986) sobre a associação *Utricularia*-Cyanophyta, afirmam em seus resultados a presença de significativa atividade de fixação de N, e que a mesma foi observada naturalmente em campos de plantio de arroz, facilitando uma correlação com a associação *Azolla* - *Anabaena* já bem estudada. Mesmo não descartando a eficiência das cianobactérias na fixação do nitrogênio, os autores afirmam a importante participação das bactérias no balanço final da atividade, requerendo estudos para uma possível utilização da associação nos campos de arrozais.

Plantas carnívoras tropicais, presentes em solos pobres em nitrogênio são encontradas em associação com bactérias de vida-livre pertencentes à família Azotobacteriaceae, e por mecanismos não muito bem conhecidos, uma associação simbiótica entre folhas e bactérias é normalmente encontrada (Prankevicus e Cameron, 1989).

Como se sabe, a fixação biológica de nitrogênio tem importância em todos os ecossistemas e as plantas dependem desta atividade para sua manutenção, principalmente em condições oligotróficas (Andrade *et al.*, 1997), característica do habitat ocupado por plantas carnívoras. Albino (2004) isolou e caracterizou trinta e quatro cepas bacterianas apresentando genes para a fixação biológica de N associadas à planta carnívora *Drosera villosa* var. *villosa*, coletadas nos Campos Gerais - PR. A exploração dos microrganismos associados a esta planta sob estas condições pode revelar muitas estratégias para utilização dos benefícios em outros modelos, inclusive agrônômicos.

REFERÊNCIAS

ADAMEC, L. Leaf absorption of mineral nutrients in carnivorous plants stimulates root nutrient uptake. **New Phytologist**, n. 155, p.89-100. 2002.

ALBINO, U. **Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas associadas à planta carnívora *Drosera villosa* var. *villosa* e seu potencial como inoculante de plantas arbóreas na presença de fungos micorrízicos arbusculares**. 2004, 73p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ANDRADE G.; ESTEBAN E.; VELASCO L.; *et al.* Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). **Plant and Soil**, n.197, p.19-23. 1997.

ANDRADE, G.; LEIJ, F.A.A.M.; LYNCH, J.M. Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. **Letters in Applied Microbiology**, n.26, p. 311-316, 1998a.

ANDRADE, G., LINDERMAN, R.G., BETHLENFALVAY, G.J. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant and Soil**, n.202, p. 79-87, 1998b.

ANDRADE, G. Interacciones microbianas em la rizosfera. In: Siqueira, J.O; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S., *et al.* (Eds.). **Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships**. Lavras: UFL Editora, 1999. p. 551-575.

ANDRADE, G. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: Varma, A., Abbott, L., Werner, D., Hampp, R. (Eds.), **Plant Surface Microbiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2004. pp. 51-68.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; *et al.* Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea*. L. **Biology and Fertility of Soils**, n.35, p.231-237, 2002.

BAGYARAJ, D.J. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In: Powell, C.L.I. e Bagyaraj, D.J. (Eds.), **VA mycorrhiza**. Flórida: Press Boca Raton, 1984. pp. 35-46.

BAKER, R. Mechanisms of biological control of soilborne pathogens. **Annual Reviews on Phytopathology**, n.6, p.263-294, 1968.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D., *et al.* Recent advances in BNF with nonlegume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, n.29, p.911-922, 1997.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, n.30, p.485-491, 2000.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plantgrowth- mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, n.25, p.2397-2406, 1999.

BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, n.81, p.343-351, 2002.

BRASIL, C. **Efeito do *Bacillus thuringiensis* sobre os grupos de microrganismos funcionais na rizosfera de milho e sorgo.** 2003, 65p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; *et al.* Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, n.27, p.225-237, 1998.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; *et al.* Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, n.174, p.195-209, 1995.

BODDEY, R.M.; SA, J.C.; ALVES, B.J.; *et al.* The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agriculture systems in the tropics. **Soil Biology Biochemistry**, n.29, p.787-799, 1997.

BUDI, S.W.; TUINEN, D. VAN; MARTINOTTI, G.; *et al.* Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, n.11, p.5148-5150, 1999.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; KLOEPPER, J.W.; *et al.* Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, n.62, p.2767-2772, 1996.

CHEN, Y.; MEI, R.; LU, S.; *et al.* The use of yield increasing bacteria as plant growth promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: Gupta, V.K. e Utkhede, R. (Eds.), **Management of Soil Born Diseases**. New Dehli: M/S Narosa Pub. House, 1994, p. 1-13.

CHET, I.; ORDENTLICH, A.; SHAPIRA, R.; *et al.* Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. In: Keister, D.L.; Cregan, P.B. (Eds.), **The Rhizosphere and Plant Growth**. , Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1991, p. 229-236.

Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <http://www.conab.gov.br/safras>>. Acesso em: 14 out. 2004.

DIDONET, D.A.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.31, p.645-651, 1996.

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

DOBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, n.15, p.211-216, 1961.

DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in associations with nonleguminous plants. **Symbiosis**, n.13, p.1-13, 1992.

FAIRHURST, T.H.; DOBERMANN, A. Rice in the global food supply. In: **Rice Production**, n.16, p.234-241, 2002.

FRANKE, I. H.; FEGAN, M.; HAYWARD, C.; *et al.* Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. **FEMS Microbiology Ecology**, n.31, p.61-71, 2000.

GALLOWAY, J.N.; SCHLESINGER, W.H.; LEVY, H.I. *et al.* Nitrogen fixation: anthropogenic enhancement – environmental response. **Global Biogeochemical**, n.9, p.235-252, 1995.

GARBAYE, J. Helper bacteria - A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, n.128, p.197-210, 1994.

GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; *et al.* Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, n.6, p.3-16, 1997.

GONZÁLES-LÓPEZ, J. Microorganismos diazotrofos asociados a raíces de plantas noleguminosas. In: González-López, J., Pla, C.L. (Eds.), **Biología del Nitrógeno**. Madrid: Ruenda, 1992, p. 71-96.

GRIFFITHS, B. S.; RITZ, K.; EBBLEWHITE, N.; *et al.* Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. **Soil Biology and Biochemistry**, n.31, p.145-153, 1999.

GRYNDLER, M.; VEJSADOVÁ, H.; VOSÁTKA, M.; *et al.* Influence of bacteria on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of maize. **Folia Microbiologia**, n.41, p.95-99, 1995.

GUALTIERI, G.; BISSELING, T. The evolution of nodulation. **Plant Molecular Biology**, n.42, p.181-194, 2000.

HILTNER, L. Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie und unter besonderer berücksichtigung und brache. **Arb. Dtsch Landwirt**, n.98, p.59-78, 1904.

HODGE, A. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. **FEMS Microbiology Ecology**, n.32, p.91-96, 2000.

International Rice Research Institute. **IRRI towards 2020**. Philipines, 1996. 43p.

IRISSARRI, P.; REINHOLD-HUREK, B. *Azoarcus* sp. Strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. **Journal of Biotechnology**, n.106, p.169-178, 2001.

ISOPI, R.; FABBRI, P.; DEL-GALLO, M.; *et al.* Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. **Symbiosis**, n.18, p.43-55, 1995.

- JOHANSSON, J., PAUL, L.R., Finlay, R.D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiology Ecology**, n.48, p.1-13, 2004.
- KOIDE, R.T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, n.3, p.365-386, 1991.
- LADHA, J.K.; BRUIJIN, F.J.; MALIK, K.A. Introduction: assessing opportunities for nitrogen fixation in rice – a frontier project. **Plant and Soil**, n.194, p.1-10, 1997.
- LADHA, J.K.; REDDY, M.P. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, n.252, p.151-167, 2003.
- MALIK, K.A.; BILAL, R.; MEHNAZ, S.; *et al.* Association of nitrogen-fixing, plant-growthpromoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and Soil**, n.194, p.37-44, 1997.
- MANSFELD-GIESE, K.; LARSEN, J.; BODKER, L. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **FEMS Microbiology Ecology**, n.41, p.133-140, 2002.
- MARSCHENER, H. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crops Research**, n56, p.203-207, 1998.
- MARSCHENER, P.; BAUMANN, K. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonization in split-root maize. **Plant and Soil**, n.251, p.279-289, 2003.
- PAUL, E.A.; CLARK F.E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, INC. USA, 1989.
- PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DOBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugar cane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, n.11, p.111-115, 1991.
- PAULITZ, T.C.; LINDERMAN, R.G. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, n.113, p.37-45, 1989.

PETERS, N.K.; FROST, J.W.; LONG, S.R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, n.233, p.977-980, 1986.

PILIAKAS, J.M.; BARBOSA, L.M. Aspectos biológicos e ecológicos de plantas carnívoras. **Ecosistema**, n.5, p.89-93, 1989.

PILIAKAS, J.M. Plantas Carnívoras. **Guia de Plantas em Casa**, n.1.,p.65, 1998.

PRANKEVICIUS, A.B., CAMERON, D.M., 1989. Free-living dinitrogen-fixing bacteria in the leaf of the northern pitcher plant (*Sarracenia purpurea* L.). **Naturaliste Canadien**, n.116, p.245-249, 1989.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; *et al.* Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, n.3, p.227-247, 2000.

RIGGS, P.J.; CHELIUS, M.K.; INIGUES, A.L.; *et al.* Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, n.28, p.829-836, 2001.

ROGER, P.A.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation in wetland rice fields: estimation and contribution to nitrogen balance. **Plant and Soil**, n.141, p.41-55, 1992.

SALA, M.R.S. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 137p Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SARIDAKIS, D.P., TOREZAN, J.M.D., ANDRADE, G. Microhabitat preferences of six *Drosera* (*Droseraceae*) from Tibagi River Basin, Paraná State, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n 47, p. 495-501, 2004.

SARIDAKIS, D.P. **Interações da microbiota associadas às raízes da planta carnívora *Drosera villosa* var. *villosa* A. St - Hil**. 2003, 78p. Dissertação (Mestrado), Universidade estadual de Londrina, Londrina.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, n.25, p.339-358, 1987.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; *et al.* Advances in Rhizobium research. **Critical Reviews in Plant Sciences** ., n.21, p.323-378, 2002.

SHENOY, V.V.; KALAGUDI, G.M.; GURUDATTA, B.V. Nitrogen autotrophic rice. **Current Science**., n.81, p.451-457, 2001.

SHRESTHA, R.K.; LADHA, J.K. Genotypic variation in promotion of rice dinitrogen fixation as determined by nitrogen-15 dilution. **Soil Science Society of America Journal**, n.60, p.1815-1821, 1996.

SÖDERBERG, K.H; OLSSON, P.A.; BAATH, E. Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant and the effect of arbuscular mycorrhizal colonization. **FEMS Microbiology Ecology**, n.40, p.223-231, 2002. (USDA) US Department of Agriculture. **Agriculture statistics**. Washington (DC): US Government Printing Office, 1995.

VÁZQUEZ, M.M.; CÉSAR, S.; AZCÓN, R.; *et al.* Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, n.15, p.261-272, 2000.

VERMA, S.C.; LADHA, J.; Tripathi, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, n.91, p.127-141, 2001.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, n.255, p.571-586, 2003.

XAVIER, L.J.C.; GERMIDA, J.J. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. **Soil Biology and Biochemistry**, n.35, p.471-478, 2003.

WAGNER, G.M.; MSHIGENI, K.E. The *Utricularia*-cyanophyta association and its nitrogen-fixing capacity. **Hydrobiologia**, n.141, p.255-261, 1986.

WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; Grotewold, E.; *et al.* Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, n.132, p.44-51, 2003.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, n.52, p.487-511, 2001.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, n.66, p.345-351, 2000.

Interaction among free living N-fixing bacteria isolated from *Drosera villosa* var. *villosa* and AM fungi (*Glomus clarum*) in rice (*Oryza sativa*)

M.P. Raimama, U. Albinob, M.F. Cruza, G.M. Lovatoa, F. Spagoa, T.P. Ferracina, D.S. Limaa, T. Goularta, C.M. Bernardia, M. Miyauchia, M.A. Nogueiraa, G. Andradea*

Universidade Estadual de Londrina, CCB, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina - PR, Brazil.

Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Cx. Postal 4301, 84030-900, Ponta Grossa - PR, Brazil.

Corresponding author. Phone No 55 43 33714791; E-mail andradeg@uel.br

Abstract

Rice is usually grown in N-deficient soils, demanding that the element be supplied to the field by commercially available N fertilizers. Unfortunately, a substantial amount of the urea-N or NO₃-N applied as fertilizers is lost through different mechanisms, causing environmental pollution problems. Utilization of biological N₂ fixation (BNF) technology can decrease the application of N fertilizers, reducing environmental risks. This study evaluated the effects of four free-living N-fixing bacterial species, isolated of the carnivorous plants, *Drosera villosa* var. *villosa*, from oligotrophic soil conditions, as single inoculants or combined with arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus clarum*), on the development of rice plants grown as flooded or upland rice, in the greenhouse. Upland rice roots were inoculated with *Methylobacterium* sp., *Burkholderia* sp. and *Sphingomonas* sp., whereas the species *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. and *Sphingomonas* sp. were inoculated on flooded rice. Inoculants consisted of individual bacterial species or their mixtures, with or without *G. clarum*. Controls included non-bacteria / non-AM fungi, and AM fungi alone. Experiments were carried out in five replicates. The presence of *G. clarum* decreased or did not significantly affect plant growth under the different culture conditions. The presence of AM fungi stimulated the N-fixing bacterial population of upland rice. Bacterial species had different effects, under both culture conditions, and some genera of N-fixing bacteria increased root and shoot growth at different plant growth stages.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza; rice; *Glomus*; nitrogen fixation; growth promotion; rhizosphere.

Introduction

Rice (*Oryza sativa*) is probably the most important cereal in the world, serving as food for about 50% of the world's population (Ladha et al., 1997). Data from the International Rice Research Institute (IRRI, 1996) show that the rice crop demands about 10 millions of tons of nitrogen fertilizers every year, all over the world. Since the demand for rice has been increasing, one can predict that the amount of fertilizer should double in the next 20 years. Optimization of biological nitrogen fixation seems like a suitable alternative to reduce the use of N fertilizers for rice (Wu et al., 1995).

Free-living N fixing bacteria, or those naturally associated to rice plants contribute little N to the case of rhizobia and legumes. However, large amounts of nitrogen derived from biological fixation have been shown to be present

in rice plants (Shenoy et al., 2001). This process can contribute with as much as 75 Kg N ha⁻¹ per crop cycle, with averages from 8 to 30 Kg N ha⁻¹ (Irisarri et al., 2001).

Recent studies have shown that several bacteria may be isolated from surface sterilized roots of flooded rice plants, suggesting endophytic colonization. Baldani et al. (2000) have tested the effectiveness of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp., and observed BNF contributions ranging from 31% to 54%, for strains of *H.* weight over uninoculated controls was also observed. There is a great degree of variability on the effect of the inoculated strain on different plants, suggesting that plant genotype influences the effectiveness of the associated diazotrophs. An evaluation of 70 rice genotypes from various origins, at different growth stages has shown that BNF contribution may range from 1.5% to 21% (Shrestha and Ladha, 1996).

The arbuscular mycorrhizal (AM) fungi constitute an important group of symbionts associated with agricultural crops. This symbiosis may enhance the root system's ability to absorb and carry phosphorus and other soil elements of low mobility, by means of a network of mycelia, thus promoting plant growth. Many authors have observed different effects of inoculation of free-living diazotrophs and AM fungi, on different species of cultivated plants. Results have indicated that the interaction between these two groups of microorganisms may, in many instances, result in improved plant growth and fungal infectivity (Barea et al., 1997; Gryndler et al., 2000), or stimulate the effectiveness of the free-living diazotrophs (Volpin and Kapulnik, 1994; Barea et al., 2002). Some researchers have observed negative results of AM fungi on BNF too (Andrade, 1999; Marschener and Baumann, 2003).

Modern biotechnology aims to combine inoculation of rhizosphere microorganisms so as to reduce the need for N fertilizer application, and maximize plant growth and nutrition. Considering that the great genetic variability among microorganisms increases their suitability to different environments, this study aimed to evaluate the efficiency of diazotrophic bacteria isolated from the rhizosphere of the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa*, as well as their interaction with the AM fungi *Glomus clarum*, when inoculated onto either upland or flooded rice plants.

Material and methods

Experimental design

All bacterial strains used in this study had been previously shown to carry a copy of the *nif H* gene (Albino, 2004). In the first experiment, 21 strains were screened for positive effects, in interaction with *G. clarum*, on the growth of both upland and flooded rice plants, measured 60 days after inoculation. The three most effective strains in each situation were selected.

In the second experiment, bacteria selected in the screening were tested for effectiveness, either as single strain inoculants or pooled, in the presence or absence of *G. clarum*. Controls included no inoculation (neither bacteria nor AM fungi) and inoculation with AM fungi alone. Bacteria selected for upland rice were *Methylobacterium* sp. (LEM5), *Burkholderia* sp. (LEM6), and *Sphingomonas* sp. (LEM58). For flooded rice, bacteria tested were *Burkholderia* sp. (LEM6), *Pseudomonas* sp. (LEM48), and *Sphingomonas* sp. (LEM58). The experiments were set in a completely randomized block design, with five replicates per treatment. Plant growth was evaluated at 6, 13, 33, and 78 days after sowed. All data were submitted to ANOVA procedures, and means were compared by the Duncan test ($p < 0,05$).

Free-living N₂-fixing bacteria

Bacterial strains LEM5, LEM6, and LEM48, from frozen stocks, were grown in Nfb medium (Döbereiner and Day, 1976), whereas strain LEM58 was grown in Burk's medium (Wilson and Knight, 1952). All strains were labeled with spontaneous antibiotic resistance marks (LEM5 Smr 300 μ g mL⁻¹, LEM6 Smr 100 μ g mL⁻¹, LEM48 Nalr 200 μ g mL⁻¹ and LEM58 Nalr 250 μ g mL⁻¹) for population evaluations during experiments. Antibiotic resistant variants were always grown in media containing antibiotics. Resistance reversion was monitored, and no revertants were observed.

Bacterial inoculum was produced by growing strains in 500 mL of either Nfb or Burk broth, on a rotary shaker (30 rpm 56h⁻¹ at 28 °C). At the log phase of growth, bacterial suspensions were centrifuged (10,000 rpm 4 min⁻¹ at 7 °C) and washed three times in phosphate buffer (PBS) plus triton (0.1%). Bacterial

concentration was adjusted to 1010 CFU mL⁻¹, according to previously established correlations between optical density and CFU numbers. Bacterial suspensions were mixed separately at 1:10 with carboxymethylcellulose 1%, and the final bacterial concentration was 109 CFU mL⁻¹. Two milliliters of each bacterial suspension were applied to each seedling.

AM fungi

AM fungi inoculum consisted of soil containing fungal spores and hyphae, as well as plant root fragments, obtained from pots grown with *Brachiaria decumbens* inoculated with *G. clarum*. Each pot in the second experiment received 2 g of AM fungi inoculum, one day before rice was planted.

Plant growth conditions

Plants were grown in a greenhouse, at 28 °C day and 22 °C night. Plants were grown in a red latosol with medium texture and the following chemical composition: Al 0.3 cmol; Ca 1.7 cmol; Mg 0.7 cmol; K 0.07 cmol; H+Al 4.9 cmol; C 10.4 g; P 2.2 mg, all per dm³ soil; pH 4.6. Soil was homogenized and mixed with sand at 4:1. The potting mixture was sterilized with steam flow (60 min day⁻¹), for three consecutive days, and distributed into 500 mL pots. Each pot received 10 ml of soil extract (500 g soil in 500 mL sterile water, filtered with filter paper No. 1), to recompose the natural microbial population of the soil, except for AM fungi.

Rice seeds (var. EPAGRI 108) were surface disinfested by immersion in 70% alcohol for 30 sec, followed by immersion in 2% sodium hypochlorite for two minutes, and then washed three times with sterile distilled water. Four seeds were sown in each pot and, three days after emergence, the stand was thinned to one plant per pot. After thinning, pots were inoculated with the free-living N-fixing bacteria tested.

Pots were watered by capillarity with distilled water. To simulate flooded conditions pots were kept in plastic trays which, in turn, remained flooded throughout the experiment. From 20 days after emergence on, each pot received, weekly, 10 mL of nutrient solution (Hewitt, 1966) containing (g L⁻¹): KNO₃ 30.3; Ca(NO₃)₂ 70.8; MgSO₄·7H₂O; Fe-EDTA 2.5; MnSO₄ 2.23; CuSO₄·5H₂O 2.4;

ZnSO₄.2H₂O 2.9; H₃BO₃ 18.6; NaH₄MoO₄ 0.35; NaH₂PO₄.2H₂O 20.8. Pots inoculated with diazotrophs plus AM fungi and mycorrhizal control pots received no N and 1/5 P; pots inoculated with diazotrophs only received no N, but full P; untreated control pots received no N and no P.

Assessment

Plant shoot samples were dried at 60 °C 48h⁻¹ and weighed. Root samples were weighed and aliquots collected for estimation of mycorrhizal colonization and root length (Newman, 1966). The shoot to root ratio was obtained dividing shoot fresh biomass by root fresh biomass. Specific root length was the quotient of measured root length over root fresh biomass. After taking the appropriate samples, the remainder of the roots was dried at 60 °C 48h⁻¹ and weighed. Mycorrhizal colonization was measured microscopically by the gridline technique of Giovanetti and Mosse (1980), on roots stained according to Phillips and Hayman (1970).

Populations of N₂-fixing bacteria inoculated were estimated by plate counts of aliquots from serial tenfold dilutions. Rhizosphere populations were estimated from a 1g sample of rhizosphere soil (stuck to the roots) collected from each plant and suspended in saline solution (NaCl 0.85%). To count bacteria in the endorhizosphere, roots were first washed in running water and then a 1 g sample was surface disinfested in 70% alcohol for 1 min and washed three times in sterile distilled water; samples were macerated in test tubes containing 9 mL sterile 30 saline solution (NaCl 0.85%). Samples from both the rhizosphere and endorhizosphere were diluted (10⁻⁴ for rhizosphere soil and 10⁻⁵ for root suspension) and 100 μ L aliquots were spread on plates of the appropriate media with antibiotics. Plates were incubated at 28 °C 5 days⁻¹ under microaerophilic conditions. The morphology of the colonies on the plates was compared to the stock cultures and the numbers of CFU were counted. Total nitrogen (mg plant⁻¹) in the shoots was determined by the Semi-micro-Kjeldahl method (Sarruge and Haag, 1974).

Results

Upland Rice

Even though it seems impossible that AM fungi have any direct effect on plant growth measured six days after sowed (DAS), there were significant differences in shoot dry weight, when inoculated plants were compared to non-inoculated plants. The bacteria tested had positive effects on shoot dry weight only when pooled. Bacterial inoculation also significantly improved root length and specific root length (Table 1).

At 13 DAS there were no significant differences among treatments (data not showed). At 33 DAS there were differences between mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. However, the mycorrhizae had a negative effect on shoot and root dry biomass, root length, and total nitrogen. On the other hand, plants inoculated with bacteria showed increased shoot dry biomass, root length (only LEM5), and total N. It is important to notice that N accumulation in plants inoculated with strains LEM5, LEM58, and with the pool of bacteria was higher than in non-inoculated plants. Other effects of bacterial inoculation have been observed. Strain LEM58 stimulated rice growth and LEM5 had effects on root growth (Table 2).

At 78 DAS, positive effects of bacterial inoculation could still be observed on plant growth, relative to controls. The best results were again observed when the bacteria were pooled. Mycorrhizal effect remained negative for all parameters, except for total N. Some bacteria had positive effects on plant growth and shoot to root ratio. Strain LEM5 performed as bad as the control. There were no significant differences in total N, except for plants inoculated with strain LEM58, which showed low N accumulation (Table 3).

Significant differences in mycorrhization were observed only after 33 DAS. Plants inoculated with strain LEM6 or the pool of bacteria showed the lowest indices of colonization at 33 DAS. At 78 DAS, only LEM6 and pool of bacteria showed significant differences (Figure 1).

Strain LEM58, either individually or as part of the pool, showed the highest counts of CFU throughout the experiment, ranging between 10^7 and 10^6 CFU g⁻¹ rhizosphere soil. At 13 DAS, AM fungi inhibited growth of N-fixing bacteria in the rhizosphere, but at 33 and 78 DAS, *G. clarum* stimulated rhizosphere populations

of the inoculated bacteria. Strains LEM58 and LEM6, as part of the pool of bacteria, were, initially, superior colonizers of the endorhizosphere. All strains showed increases in the numbers of CFU at 13 DAS, except LEM58. However, LEM5 and LEM6 achieved smaller populations when applied as single inoculants. From 33 DAS on, until the end of the experiment, LEM58 achieved larger endorhizosphere populations, and this effect was due to the presence of *G. clarum*.

Flooded Rice

At 6 DAS, mycorrhizal plants had lower shoot dry biomass than non-mycorrhizal plants. However, this effect cannot be attributed to the presence of AM fungi, since plants were still very young. On the other hand, there were clear effects of bacteria on shoot to root ratio and on root length. The bacterial pool or strain LEM48 promoted a significant increase in root growth, reducing the shoot to root ratio (Table 4).

At 13 DAS, there were no significant differences for any of the variables studied (data not showed). At 33 DAS, plants inoculated with the pool of bacteria showed the lowest root dry weight. However, these plants presented the highest shoot to root ratio and, along with strain LEM6, the highest N content. AM fungi had a negative effect on root length, being mycorrhizal roots shorter than non-mycorrhizal, and on total N. In other words, mycorrhizal plants showed lower N contents in the shoots. Bacteria had negative effects on root length and on specific root length (Table 5).

At 78 DAS, shoot dry biomass was higher for plants inoculated with strain LEM6. In the case of plants inoculated with the bacterial pool, shoot dry biomass was significantly lower than the control. Strains LEM48, LEM58, and the pool of bacteria promoted lower N content in the shoot than the control. Roots from plants inoculated with the bacterial pool were significantly shorter than those from control plants. Growth of the shoots and roots, and specific root length of mycorrhizal plants was lower N content was also lower in these plants (Table 6). Root colonization by AM fungi under flooded conditions was low for all treatments, reaching an average 15% (Figure 2).

At 6 DAS, strains LEM48 and LEM58 were better colonizers of the rhizosphere when pooled with the other strains. At 13 DAS, both strains showed the

largest rhizosphere populations either when pooled or inoculated separately, and the same trend continued on to 33 DAS. At 78 DAS, strain LEM48 showed the highest CFU counts, and was not significantly different from strain LEM58 when pooled. Strain LEM48, inoculated separately or pooled, was the poorest survivor in the endorhizosphere at 6 DAS. At 13 DAS, strains LEM48 and LEM58 had the highest CFU counts, when both were inoculated separately. LEM48 repeated this trend when pooled. At 33 DAS, strain LEM58 was dominant in the rhizosphere. At 78 DAS, LEM6 had significantly lower CFU counts than the other strains, both when inoculated separately or pooled.

Discussion

Upland Rice

It is largely known that rhizobacteria and AM fungi increase plant growth (Basham, 1999; Barea et al., 2002). Many authors, however, have observed opposite effects of this interaction, occasionally decreasing plant growth (Berta et al., 1995; Andrade et al., 1998a). In the present study, we observed that the presence of *G. clarum* decreased plant growth at all evaluation times or had no significant effects when compared with controls. Reduction in plant growth may be attributed, in some cases, to the exchange of P and C available as nutrient sources for plants and microorganisms (Graham and Abbott, 2000; Söderberg et al., 2002). This fact is reinforced by the low content of nutrients in the soil used in this study.

Different responses were observed in the bacterial effect, which improved plant growth. Strains LEM58 and the pool of bacteria were the most effective inoculants tested. Many authors described this effect, but they tested single strain treatments (Baldani et al., 2000; Adhikari et al., 2001).

This was the first time that N₂-fixing bacteria isolated from the roots of carnivorous plants which live in complete oligotrophic conditions were used as inoculum. Root growth was also stimulated by the bacterial inoculum, and this effect was apparently caused only by the presence of bacteria, but not by AM fungi or the interaction between them. The bacteria may be involved in the production of substances, which promote plant and root growth (Dobbelaere et al., 2003).

At 78 days after bacterial inoculation, plants inoculated with bacteria and AM fungi showed shorter roots than control plants; non-inoculated plants need longer roots to supply enough nutrients for plant growth (Marschener, 1995). In contrast with these study, Gyaneshwar et al. (2001) observed that root length and specific root length increased when flooded rice plants were inoculated with the IRBG500 line of *Serratia mercescens* in non-sterile soil.

On the other hand, the presence of *G. clarum* caused a decrease in root length since 33 days, but not in specific root length. Negative effects of AM fungi on root growth have been previously observed (Marschener and Crowley, 1996; Mishra and Sinha, 2000).

The relationship between shoot and root shows that the bacteria significantly stimulated shoot growth only 78 DAS, when strain LEM6 promoted the highest ratio of shoot to root fresh biomass. The effects on root growth were observed at 6 DAS, and may be correlated with the best performance of plants observed 78 DAS. These bacteria may have a direct effect on root growth, due to the production of growth-promoting substances which, in turn, have an indirect effect on shoot growth. Rhizobacteria are known to be an important group of microorganisms which take part in important ecosystem processes, such as those involved in nutrient cycling and/or seedling establishment and soil quality (Kloepper et al., 1991; Jeffries and Barea, 2001).

There is a clear relationship between plant growth and the numbers of CFU which remained on the roots during the 78 days of the experiment. Both the rhizosphere and endorhizosphere were colonized to similar extents, but some strains of bacteria were certainly favored by pooling, as shown by their larger populations when compared to single inoculations. Our results agree with those of Kloepper et al. (1991), who observed that the ability to colonize the roots is essential for promoting plant growth.

After its establishment, the AM fungus *G. clarum* stimulated the populations of inoculant bacteria. Similar effects of AM fungi on the growth of free-living bacteria in the mycorrhizosphere have been observed by Andrade et al. (1998b). On the other hand, the strains of N-fixing bacteria had no influence on mycorrhization. Similar effects have been observed by other authors (Gryndler, 2000; Barea, 2000).

Bacteria were also efficient at N fixation, since the N content of inoculated plants, measured at 33 DAS, was three times higher than uninoculated controls. Plants inoculated with strain LEM58 supported large bacterial populations on their roots, showed high N contents and better shoot growth at 33 DAS, suggesting that this strain may serve as an inoculant for upland rice. However, field studies must be carried out before one can draw any conclusions. The differences in N content observed only at 33 DAS suggests that rice plants, at this stage, are in full growth and demand large amounts of N. Mycorrhizal plants showed lower N contents. It has been shown that, in some cases, the presence of AM fungi may reduce N content, presumably because of the competition for carbon between the bacteria and the fungi (Pacovsky et al., 1985; Linderman, 1992).

Flooded Rice

Flooded rice plants inoculated with *G. clarum* also showed lower shoot dry biomass. This effect has already been observed by others (Solaiman et al., 1995; 2003). Under flooded conditions, even with low levels of mycorrhizal colonization, negative effects on plant growth have also been observed. Some authors suggest that this may be related to the capacity of the fungus to draw photosynthates, thus depressing the growth of the host plant (Moreira and Siqueira, 2002). Low soil P availability may affect this too, since root colonization may be inhibited, altering the level of interaction between plant and fungus, as both demand relatively large amounts of P (Smith and Read, 1997).

The most noticeable effect of bacterial inoculation on plant growth was observed at 33 DAS, in contrast with the situation for upland rice. Root length, as in the case of upland rice, was shorter in the presence of AM fungi, where the bacterial pool stimulated root growth at the initial stages.

It is largely known that the inoculation with bacteria has different effects on AM colonization (Andrade et al., 1998b; Barea, 2000). In the present study, the presence of rhizobacteria did have an influence on AM colonization. On the other hand, the AM fungi did not have any influence on free-living N₂-fixing bacteria.

Bacteria inoculated as a pool showed better survival and attained larger rhizosphere populations when compared to endorhizosphere populations.

These results suggest that the low amount of P and poor colonization of AM fungi should be influenced the bacterial populations and root colonization (Andrade, 2004).

N content was lower in mycorrhizal plants, suggesting that nitrogen fixation followed the same trend. Too many factors may have influenced nitrogen fixation in the flooded system, such as reduced root colonization by AM fungi that, in turn, reduces the mycorrhizosphere effect (Linderman, 1992), affecting the establishment of inoculated bacteria in the endorhizosphere.

We concluded that the rice seems to have different mechanisms to interact with N-fixing bacteria and AM fungi, according to the cropping system. Even though different genera of bacteria were used for inoculation, under both cropping systems, the low level of mycorrhizal infection under flooded conditions does not seem to be detrimental to nitrogen fixation efficiency or plant growth promotion by the bacteria. Our study has shown that N-fixing bacteria were able to stimulate shoot and root growth of inoculated rice plants, and that this effect does not depend on the way rice is grown, the genera of bacteria inoculated or the level of mycorrhizal colonization.

References

Adhikari, T.B., Joseph, C.M., Yang, G.P., Phillips, D.A., Nelson, L.M., 2001. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Can. J. Microbiol.* 47, 916-924.

Albino, U., 2004. Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas associadas à planta carnívora *Drosera villosa* var. *villosa* e seu potencial como inoculante de plantas arbóreas na presença de fungos micorrízicos arbusculares. 73p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

Andrade, G., De Leij, F.A.A.M., Lynch, J.M., 1998a. Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 311-316.

Andrade, G., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J., 1998b. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Soil* 202, 79-87.

- Andrade, G., 1999. Interacciones Microbianas en La Rizosfera. In: Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., Lopes, A.S., Guilherme, L.R.G., Faquim, V., Furtini Neto, A.E., Carvalho, J.G. (Eds.) Soil Fertility, Soil Biology and Plant Nutrition Interrelationships, Editora UFLA, Lavras, pp. 551-574
- Andrade, G., 2004. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: Varma, A., Abbott, L., Werner, D., Hampp, R. (Eds.), Plant Surface Microbiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 51-68.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Dobereiner, J., 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. Biol. Fertil. Soils 30, 485- 491.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., Azcón, R., 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: Gange, A.C. and Brown, V.K. (Eds.), Multitrophic interactions in terrestrial systems, Blackwell Science, Cambridge, England, pp. 65-77
- Barea, J.M., 2000. Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: Toutant, J.P., Balazs, E. (Eds.), Biological Resource Management: Connecting Science and Policy (OECD), Springer, Berlin Heidelberg, pp.110-125.
- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. Antonie van Leeuwenhoek 81, 343-351.
- Basham, Y., 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. Biol. Fertil. Soils 29, 246- 256.
- Berta, G., Trotta, A., Fusconi, A., Hooker, J.E., Munro, M., Atkinson, D., Giovannetti, M., Morini, S., Fortuna, P., Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., 1995. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and roots system morphology in *Prunus cerasifera*. Tree Physiol. 15, 281-293.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y., 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. 22, 107-149.
- Döbereiner, J., Day, J.M., 1976. Associative simbiosys in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Proceedings of the 1st International Symposium of Nitrogen Fixation, Washington State University Press, Pulman, USA. p. 518- 538.

Giovanetti M., Mosse B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in roots. *New Phytol.* 84, 489-500.

Graham, J.H., Abbott, L.K., 2000. Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 220, 207–218.

Gryndler, M., 2000. Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. In: Kapulnik, Y., Douds, D.D. Jr (Eds.) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 239-262.

Gryndler, M., Hrselová, H., Stríteska, D., 2000. Effect of soil bacteria on growth of hyphae of the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus claroideum*. *Folia Microbiol.* 45, 545-551.

Gyaneshwar, P., James, E.K., Mathan, N., Reddy, P.M., Reinhold-Hurek, B., Ladha, J.K., 2001.

Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183, 2634-2645.

Hewitt, E., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux. Faruham Royal, UK, 300pp.

Irissarri, P., Reinhold-Hurek, B., 2001. *Azoarcus* sp. Strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotech.* 106, 169-178.

IRRI 1996. IRRI towards 2020. International Rice Research Institute. Philippines, pp. 43. Jeffries, P., Barea, J.M., 2001. Arbuscular Mycorrhiza - a key component of sustainable plantsoil ecosystems. In: Hock, B. (Ed.) *The Mycota. Vol. IX Fungal Associations*, Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 95-113.

Kloepper, J.W., Zablutowick, R.M., Tipping, E.M., Lifshitz, R., 1991. Plant growth promotion mediated by bacteria rhizosphere colonizers. In: Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.) *The Rhizosphere and Plant Growth*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 315-326.

Ladha, J.K., Bruijin, F.J., Malik, K.A., 1997. Introduction: assessing opportunities for nitrogen fixation in rice – a frontier project. *Plant Soil* 194, 1-10.

Linderman, R.G., 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G. (Eds.) *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*, ASA Spec. Publ., Madison, Wisconsin, pp. 45-70.

Marschner H., 1995. The soil root interface (Rhizosphere) in relation to mineral nutrition. In: Marschner, H. (Ed), *Mineral nutrition of higher plants*, Academic Press Limited, London, pp. 537-595.

Marschner, P., Crowley, D.E., 1996. Physiological activity of a bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* (strain 2-79) in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annum* L.). *Soil Biol. Biochem.* 28, 869-876.

Marschner, P., Baumann, K., 2003. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonization in split-root maize. *Plant Soil* 251, 279-289.

Mishra, D.S., Sinha, A.P., 2000. Plant growth-promoting activity of some fungal and bacterial agents on rice seed germination and seedling growth. *Trop. Agric.* 3, 188-191.

Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., 2002. Micorrizas. In: Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. (Eds.) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*, Editora UFLA, Lavras, pp. 473-573.

Newman E.I., 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.* 3, 139-145.

Pacovsky, R.S., Fuller, G., Paul, E.A., 1985. Influence of soil on the interactions between endomycorrhizae and *Azospirillum* in sorghum. *Soil Biol. Biochem.* 17, 525-531.

Philips D.A., Hayman D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158-161.

Sarruge, J.R., agricultura "Luiz de Queiroz". 56pp. Shenoy, V.V., Kalagudi, G.M., Gurudatta, B.V., 2001. Nitrogen autotrophic rice. *Current Sci.* 81, 451-457.

Shrestha, R.K., Ladha, J.K., 1996. Genotypic variation in promotion of rice dinitrogen fixation as determined by nitrogen-15 dilution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 1815-1821.

Smith, E.S., Read, J.D., 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego, 605pp.

Söderberg, K.H., Olsson, P.A., Baath, E., 2002. Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant and the effect of arbuscular mycorrhizal colonization. FEMS Microbiol. Ecol. 40, 223-231.

Solaiman, M.Z., Hirata, H., 1995. Effects of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi in paddy fields on rice growth and N, P, K nutrition under different water regimes. Soil Sci. Plant Nutr. 41, 505-514.

Solaimam, M.Z., Abbott, L.K., 2003. Phosphorus uptake by a community of arbuscular mycorrhizal fungi in jarrah forest. Plant Soil 248, 313-320.

Volpin, H., Kapulnik, Y., 1994. Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In: Okon, Y. (Ed.) *Azospirillum/Plant Associations*, CRC Press, Boca Raton, pp. 111-118.

Wilson, P.W., Knight, S.C., 1952. Expeciments in bacterial physiology. Burguees, Minneapolis, 49pp. 41

Wu, P., Zhang, G., Ladha, J.K., McCouch, S.R, Huang, N., 1995. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N₂ fixation in the rhizosphere by irrigated rice plants.

Theor. Appl. Genet. 91, 1171-1183.

Table 1. Shoot dry biomass (g), shoot:root ratio (g g⁻¹), root length (cm), specific root length (cm g⁻¹) of rice in drained conditions after 6 days after sowed. Means with the same letter are not significantly different of Duncan test ($p = 0.05$). Treatment Bacterium

0.011 Bacterium AM 0.005

Treatment	Shoot Dry Biomass	Shoot:Root Ratio	Root Length	Specific Root Length
Bacterium				
Control	0.007 b	0.892 a	34.67 b	604.8 b
LEM5	0.007 ab	0.899 a	59.44 a	930.7 a
LEM6	0.008 ab	0.905 a	66.10 a	974.1 a
LEM58	0.007 ab	0.898 a	52.94 ab	875.8 a
POOL	0.009 a	1.007 a	64.70 a	991.3 a
AM fungi				
Non-AM	0.009 a	0.956 a	55.79 a	840.6 a
AM	0.007 b	0.884 a	55.35 a	910.0 a
<u>ANOVA</u> (<i>p</i> -values)				
Bacterium	0.239	0.760	0.009	0.011
AM	0.005	0.270	0.940	0.346
B x AM	0.230	0.078	0.539	0.208

Table 2. Shoot dry biomass (g), root dry biomass (g), shoot:root ratio (g g⁻¹), root length (cm), specific root length (cm g⁻¹) and total N (mg plant⁻¹) in shoot of rice in drained conditions after 33 days after sowed. Means with the same letter are not significantly different of Duncan test ($p = 0.05$).

Treatment	Shoot Dry Biomass	Root Dry Biomass	Shoot:Root Ratio	Root Length	Specific Root Length	Total N
Bacterium						
Control	0.126 b	0.040 a	1.436 a	1205 b	2550 a	1.47 b
LEM5	0.140 ab	0.046 a	1.178 a	1554 a	2412 ab	4.09 a
LEM6	0.142 ab	0.041 a	1.146 a	1232 ab	1898 c	0.69 b
LEM58	0.160 a	0.042 a	1.178 a	1087 b	1573 c	4.50 a
POOL	0.141 ab	0.043 a	1.227 a	1287 ab	2041 bc	4.09 a
AM fungi						
Non-AM	0.150 a	0.045 a	1.221 a	1388 a	1991 a	3.63 a
AM	0.133 b	0.039 b	1.263 a	1158 b	2199 a	2.30 b
<u>ANOVA</u> (<i>p</i> -values)						
Bacterium	0.033	0.625	0.112	0.057	0.0007	<.0001
AM	0.011	0.026	0.556	0.023	0.154	<.0001
B x AM	0.387	0.903	0.587	0.155	0.408	0.453

Table 3. Shoot dry biomass (g), root dry biomass (g), shoot:root ratio (g g⁻¹), root length (cm), specific root length (cm g⁻¹) and total N (mg plant⁻¹) in shoot of rice in drained conditions after 78 days after sowed. Means with the same letter are not significantly different of Duncan test ($p = 0.05$).

Treatment	Shoot Dry Biomass	Root Dry Biomass	Shoot:Root Ratio	Root Length	Specific Root Length	Total N
Bacterium						
Control	0.854 b	0.417 a	1.125 c	7155 a	3055 a	8.96 a
LEM5	0.915 ab	0.415 a	1.297 bc	6597 ab	2902 a	7.15 ab
LEM6	0.970 ab	0.385 a	1.592 a	5047 ab	2571 a	7.97 ab
LEM58	0.912 ab	0.366 a	1.426 ab	4836 b	2542 a	4.78 b
POOL	1.008 a	0.399 a	1.500 ab	5576 ab	2890 a	9.36 a
AM Fungi						
Non-AM	1.072 a	0.472 a	1.358 a	7158 a	2953 a	8.00 a
AM	0.792 b	0.321 b	1.418 a	4526 b	2631 a	9.43 a
<u>ANOVA</u> (<i>p</i> -values)						
Bacterium	0.073	0.355	0.0008	0.106	0.742	0.079
AM	<.0001	<.0001	0.380	0.0001	0.269	0.510
B x AM	0.256	0.045	0.001	0.824	0.056	0.0001

Table 4. Shoot dry biomass (g), shoot:root ratio (g g⁻¹), root length (cm), specific root length (cm g⁻¹) of rice in flooded conditions after 6 days after sowed. Means with the same letter are not significantly different of Duncan test ($p = 0.05$).

Treatment	Shoot Dry Biomass	Shoot:Root Ratio	Root Length	Specific Root Length
Bacterium				
Control	0.010 ab	0.997 a	81.12 b	1221 a
LEM6	0.011 ab	0.790 b	78.33 b	971 a
LEM48	0.008 b	0.590 c	83.44 b	843 a
LEM58	0.011 a	0.843 ab	106.04 ab	1264 a
POOL	0.010 ab	0.587 c	120.59 a	1150 a
AM fungi				
Non-AM	0.011 a	0.778 a	97.15 a	1156 a
AM	0.009 b	0.744 a	90.65 a	1023 a
<hr/>				
ANOVA (<i>p</i> -values)				
Bacterium	0.211	<.0001	0.020	0.154
AM	0.033	0.531	0.481	0.272
B x AM	0.307	0.182	0.017	0.088

Table 5. Shoot dry biomass (g), root dry biomass (g), shoot:root ratio (g g⁻¹), root length (cm), specific root length (cm g⁻¹) and total N (mg plant⁻¹) in shoot of rice in flooded conditions after 33 days after sowed. Means with the same letter are not significantly different of Duncan test ($p = 0.05$).

Treatment	Shoot Dry Biomass	Root Dry Biomass	Shoot:Root Ratio	Root Length	Specific Root Length	Total N
Bacterium						
Control	0.190 a	0.067 ab	1.210 c	3227 a	4178 a	4.68 b
LEM6	0.211 a	0.071 a	1.415 bc	1073 b	1407 b	5.92 a
LEM48	0.217 a	0.064 abc	1.396 bc	1017 b	1279 b	5.40 ab
LEM58	0.200 a	0.053 bc	1.581 ab	819 b	1278 b	5.41 ab
POOL	0.207 a	0.050 c	1.736 a	666 b	1160 b	6.04 a
AM fungi						
Non-AM	0.207 a	0.062 a	1.462 a	1528 a	2009 a	6.01 a
AM	0.203 a	0.060 a	1.473 a	1193 b	1712 a	4.98 b
<u>ANOVA</u> <u>(p-values)</u>						
Bacterium	0.494	0.015	0.0002	<.0001	<.0001	0.079
AM	0.698	0.668	0.874	0.033	0.122	0.002
B x AM	0.068	0.578	0.046	0.182	0.336	0.040

Table 6. Shoot dry biomass (g), root dry biomass (g), shoot:root ratio (g g⁻¹), root length (cm), specific root length (cm g⁻¹) and total N (mg plant⁻¹) in shoot of rice in flooded conditions after 78 days after sowed Means with the same letter are not significantly different of Duncan test ($p = 0.05$).

Treatment	Shoot Dry Biomass	Root Dry Biomass	Shoot:Root Ratio	Root Length	Specific Root Length	Total N
Bacterium						
Control	0.958 b	0.665 a	1.012 a	1362 ab	4001 ab	10.19 a
LEM6	1.112 a	0.490 ab	0.965 a	1321 ab	3399 b	11.29 a
LEM48	0.929 bc	0.388 b	1.048 a	1127 ab	3580 ab	6.72 b
LEM58	0.879 bc	0.494 ab	0.879 a	1605 a	4887 a	7.16 b
POOL	0.810 c	0.394 b	1.015 a	1004 b	3417 b	5.20 b
AM fungi						
Non-AM	1.045 a	0.591 a	0.934 a	1595 a	4408 a	9.56 a
AM	0.830 b	0.381 b	1.034 a	973 b	3306 b	6.66 b
<u>ANOVA</u> (<i>p</i> -values)						
Bacterium	0.0004	0.043	0.280	0.114	0.129	0.0002
AM	<.0001	0.001	0.065	0.0001	0.009	0.001
B x AM	0.002	0.073	0.409	0.965	0.476	0.0002

Figure legends

Figure 1. Mycorrhizal colonization of root rice cultivated in drained conditions at 13, 33 and 78 days after sowed. Values are the means of 5 replicates \pm SE. Means for each time with the same letter are not significantly different of Duncan test ($p = 0.05$).

Figure 2. Mycorrhizal colonization of root rice cultivated in flooded conditions at 33 and 78 days after sowed. Values are the means of 5 replicates \pm SE. Means for each time with the same letter are not significantly different of Duncan test ($p = 0.05$).

Figure 1

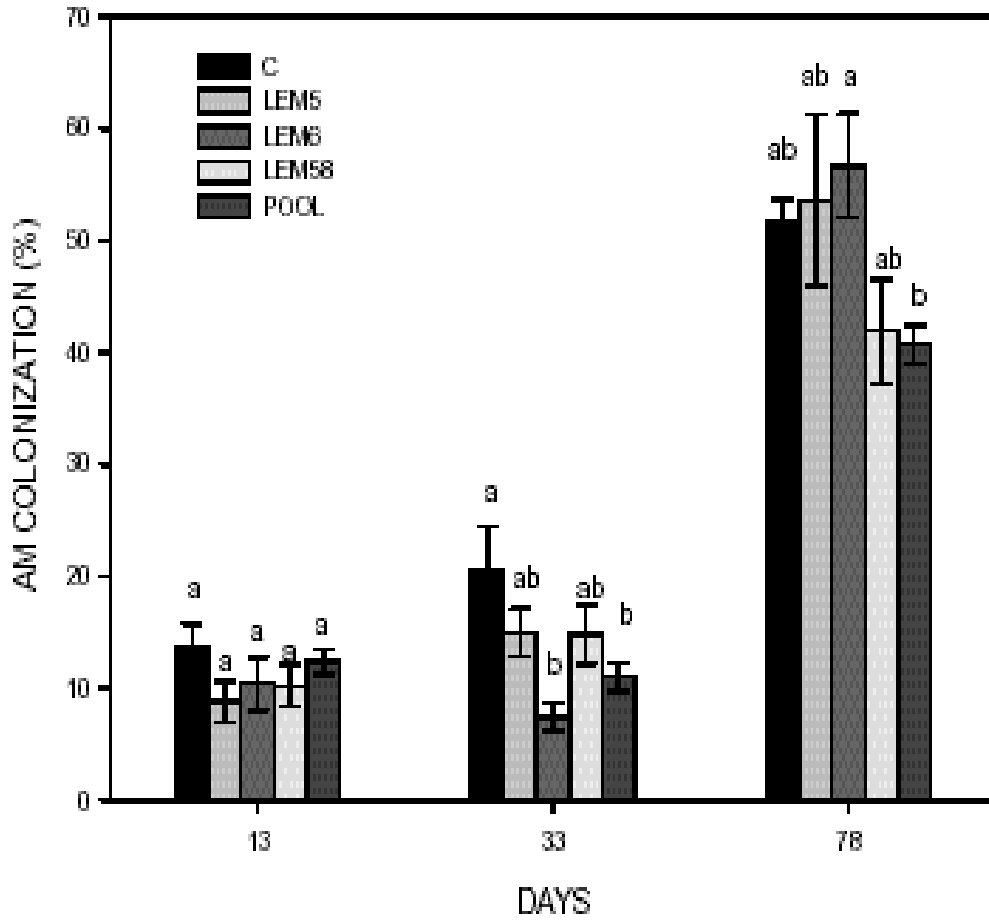


Figure 2

