

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ECOLOGIA, NUTRIÇÃO MINERAL E REGULAÇÃO
DIFERENCIAL DAS BOMBAS DE PRÓTONS EM RAÍZES DE
ARROZ (*Oryza sativa*) INOCULADAS COM *Herbaspirillum*
seropedicae HRC54**

RENDERSON ALBINO SILVA

VILA VELHA
DEZEMBRO / 2015

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS**

**ECOLOGIA, NUTRIÇÃO MINERAL E REGULAÇÃO DIFERENCIAL
DAS BOMBAS DE PRÓTONS EM RAÍZES DE ARROZ (*Oryza sativa*)
INOCULADAS COM *Herbaspirillum seropedicae* HRC54**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do Grau de Mestre em Ecologia.

RENDERSON ALBINO SILVA

VILA VELHA

DEZEMBRO / 2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S586e Silva, Renserson Albino.
Ecologia, nutrição mineral e regulação diferencial das bombas de prótons em raízes de arroz (*Oryza sativa*) inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 / Renserson Albinoz Silva. – 2015.
38 f.: il.
Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.
Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) Universidade Vila Velha, 2015.
Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Fertilizantes. 3. Contaminação. I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

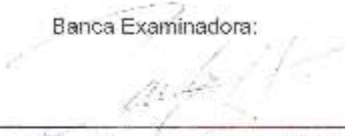
RENDERSON ALBINO SILVA

**ECOLOGIA, NUTRIÇÃO MINERAL E REGULAÇÃO DIFERENCIAL
DAS BOMBAS DE PRÓTONS EM RAÍZES DE ARROZ (*Oryza sativa*)
INOCULADAS COM *Herbaspirillum seropedicae* HRC54**

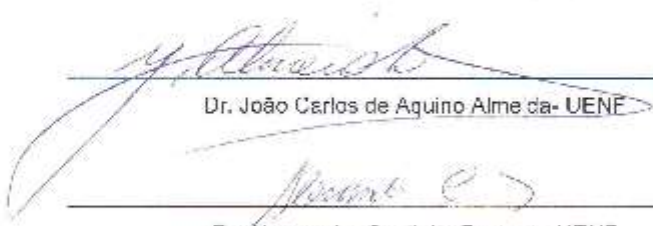
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ecologia
de Ecossistemas, para a obtenção do
Grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 17 de dezembro de 2015

Banca Examinadora:



Dr. Carlos Eduardo Tadokoro - UWF



Dr. João Carlos de Aquino Almeida - UENF



Dr. Alessandro Coutinho Ramos - UENF

Orientador

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Maurilio da Silva e Vereni Nogueira Penido e a minhas queridas, esposa Andressa Guimarães de Oliveira Albino e filha Isabela de Oliveira Albino.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e a saúde para tocar este projeto.

A minha família pela compreensão das horas dedicadas ao estudo

A Universidade Vila Velha pela oportunidade desta Pós Graduação.

A Universidade Estadual Norte Fluminense UENF por ter cedido o laboratório.

Ao meu orientador pela paciência, compreensão e por me facilitar os caminhos do aprendizado.

Ao amigo, mestrando, Sávio Bastos de Souza, pelas horas dedicadas em me ajudar no experimento e discutindo comigo os resultados e a doutoranda Gabriela Canton por revisar meus textos e colaborar em algumas etapas de trabalho.

Aos professores do Programa De Pós-Graduação em Ecologia De Ecossistemas pelo aprendizado.

Aos coordenadores do programa, prof.^o Dr. Charles Gladstone Duca Soares e prof.^o Dr. Levy de Carvalho Gomes.

Aos amigos da pós graduação que compartilharam comigo dos estudos, e em especial, os colegas do laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB).

Ao Instituto Federal do Espírito Santo - Campos Vila Velha por ter me concedido licença para me dedicar aos estudos.

“A palavra proferida no tempo certo é como
frutas de ouro incrustadas numa escultura de prata.”

Provérbio de Salomão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 O cultivo do arroz	14
3.2 Importância social e econômica	14
3.3 Necessidades nutricionais e de cultivo.....	15
3.4 Fixação biológica de nitrogênio e o arroz.....	15
3.5 Interações entre os microrganismos da rizosfera e a planta	16
3.6 Bactérias Promotoras De Crescimento Vegetal – BPCV.....	17
3.7 Mecanismo de ação das bactérias promotoras de crescimento vegetal	17
3.8 Interação entre as endobactérias diazotróficas e as plantas.....	18
3.9 Endobactérias diazotróficas <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Material Vegetal e local de execução	20
4.2 Preparo do substrato, germinação das sementes e plantio.....	20
4.3 Material biológico e inoculação	20
4.4 Isolamento de membrana.....	21
4.5 Hidrólise do ATP	21
4.6 Indicadores de Crescimento Vegetal.....	22
4.7 Avaliação Nutricional.....	22
4.8 Análise Estatística	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Parâmetros de crescimento.....	24
5.2 Bombas de prótons	26
5.3 Acumulação de nutrientes na parte aérea.....	28
6 CONCLUSÕES	30
7 REFERÊNCIAS.....	31

Silva, Renderson Albino. Universidade Vila Velha - ES, dezembro de 2015. Ecologia, nutrição mineral e regulação diferencial das bombas de prótons em raízes de arroz (*Oryza sativa*) inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54. Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

RESUMO

A baixa fertilidade dos solos tropicais e precipitações são os principais limitantes da produção de arroz (*Oryza sativa*), por isto, os fertilizantes são utilizados em grandes quantidades causando alterações na dinâmica das comunidades de micro-organismos e a contaminação de rios e lagos. Uma opção ecologicamente sustentável para substituir os fertilizantes sintéticos, sem alterar a dinâmica das cadeias tróficas é a utilização da associação de plantas de arroz com as bactérias diazotróficas endofíticas. Estas bactérias auxiliam a planta na produção de auxina, responsável em intensificar a atividade das H⁺-ATPases do tipo V e as H⁺-PPases do vacúolo e aumentando a absorção de nutrientes. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o a ecologia, crescimento, nutrição e atividade de H⁺-ATPase de membrana plasmática e vacuolar, além da H⁺-PPase vacuolar em plantas de arroz inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae*. O experimento foi realizado na casa de vegetação e 120 dias após a inoculação foram determinados, a altura das plantas, o diâmetro do caule, o peso da matéria seca da parte aérea e os conteúdos dos macronutrientes, N, P, K, Mg, Ca e S presentes nas folhas. A atividade das P- H⁺-ATPase e V- H⁺APPase foram superiores nas plantas inoculadas em relação ao controle, e por consequência a concentração de todos os macronutrientes. Plantas inoculadas com *H. seropedicae* HRC54 apresentaram um incremento superior a 120 % no conteúdo de N, 350% de P, 440% de K, 150% de Ca, 96% de Mg e 300% de S. Esta nutrição elevada correlacionou com incrementos na altura, peso da matéria seca e diâmetro do caule, em 57%, 67% e 195%, respectivamente. Os resultados indicam que a interação com o endófito favoreceu a assimilação dos nutrientes pela maior atividade das bombas vacuolares, principalmente pela PPase. Com esses dados, pode-se concluir que as bombas de prótons participam diretamente do processo de promoção do crescimento em plantas de arroz induzido pela interação com *H. seropedicae*.

Palavras-chave: bactérias promotoras de crescimento vegetal, assimilação de nitrogênio.

Silva, Renderson Albino. Universidade Vila Velha - ES, dezembro de 2015. Ecologia, nutrição mineral e regulação diferencial das bombas de prótons em raízes de arroz (*Oryza sativa*) inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54. Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

ABSTRACT

The low fertility of tropical soils and rainfall are the main limiting rice (*Oryza sativa*) production, therefore, fertilizers are used in large quantities causing changes in the dynamics of micro-organisms communities and the contamination of rivers and lakes. An environmentally sustainable option to replace synthetic fertilizers, without changing the dynamics of food webs is the use of rice plants association with endophytic diazotrophic bacteria. These bacteria boost the production of plant auxin responsible for intensify the activity of type V- H⁺-ATPase and H⁺-PPase from vacuole thus increasing the absorption of nutrients. In this context, this study aimed to evaluate the ecology, growth, nutrition and activity of H⁺-ATPase of plasma and vacuolar membrane, in addition to vacuole H⁺-PPase in rice plants inoculated with *Herbaspirillum seropedicae*. The experiment was conducted in a greenhouse. 120 day after the inoculation it were determined the plant height, stem diameter, dry weight of shoot and the content of macronutrients, N, P, K, Mg and S present in the leaves. The activity of P- H⁺-ATPase and V- H⁺-ATPase were higher in inoculated plants compared to control, and therefore all the macronutrients. Plants inoculated with *H. seropedicae* HRC54 showed an increment of 120% in the content of N, 350% of P, 440% of K, 150% of Ca, 96% of Mg and 300% of S. This high nutrition correlated with increases in height, dry weight and stem diameter, in 57%, 67% and 195%, respectively. The result indicate that the interaction with the endophytic diazotrophic bacteria favor the assimilation of nutrients by increased activity of vacuolar pumps, mainly by PPase. With this data, we can conclude that H⁺ pumps directly participate in the growth-promoting process on rice plants induced by interaction with *H. seropedicae*.

Key words: plant growth-promoting bacteria, nitrogen assimilation, macronutrients.

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) desponta como terceiro alimento mais produzido no mundo, graças ao baixo custo de sua produção e ao alto valor nutricional que fazem deste cereal a base alimentar de mais de um terço da população mundial (Wagh et al., 2014).

Para atender a demanda global estima-se que a sua produção de arroz necessite ser elevada em 30% até o ano de 2030 (FAO, 2012), neste contexto, os sistemas produtivos têm intensificado o uso de agroquímicos para aumentar a produtividade (Duvick, 2005; Savci, 2012), e desta forma, a agricultura convencional tem contribuído diretamente na contaminação dos solos e por consequência águas subterrâneas e superficiais, além de afetar a diversidade e funcionalidade de micro-organismos rizosféricos (Shahzad et al., 2013).

Por isto, novas tecnologias que otimizem a produtividade vegetal e que não agridam o meio ambiente se fazem necessárias. Uma opção ecologicamente sustentável ao uso de agroquímicos é a utilização de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV) associados as culturas de interesse agrícola, tal qual o arroz (Arruda et al., 2013). Estes micro-organismos apresentam diversos benefícios a estas culturas, como é o caso das bactérias *Herbaspirillum seropedicae*, que além de fixar nitrogênio participam também do controle direto e indireto de patógenos, favorecendo o desenvolvimento da planta hospedeira (Bhattacharyya e Jha, 2012). Outro benefício encontrado em plantas inoculadas com estas bactérias é a maior produção de fitohormônios, dentre estes a auxina. Acredita-se que devido a maior produção deste hormônio, plantas inoculadas com *H. seropedicae* apresentem maior atividade das H⁺-ATPases de membrana plasmática, amplificando assim a capacidade de absorção de nutrientes por estas plantas (Canellas, 2013).

As bombas de H⁺ constituem os sistemas de transporte primários em membranas celulares dos vegetais (Shavrukov e Hirai, 2015; Sondergaard et al. 2004). Nesses organismos a absorção de nutrientes ocorre via transportadores secundários de H⁺, os quais necessitam do aporte de energia que é fornecido pelos sistemas de transporte primários (Gaxiola, 2007). Deste modo, as H⁺-ATPases do tipo P e V e as H⁺-pirofosfatases (H⁺-PPases) geram uma força próton-motora que energiza os transportadores secundários de elétrons (Shavrukov e Hirai, 2015; Sze et al. 1999).

A H⁺-ATPase do tipo P desempenha importantes funções no desenvolvimento da célula vegetal. Esta bomba eletrogênica hidrolisa ATP para gerar um movimento de H⁺ em direção ao apoplasto, este gradiente de prótons atua como uma força motriz para viabilizar o transporte ativo de íons e outros metabólitos por meio de sistemas secundários de transporte que realizam o co-transporte de íons H⁺ acoplado ao transporte de substâncias para dentro e fora da célula (Hu-Cheng et al., 2003). Um maior aporte de prótons, gerados por estas bombas, promove a acidificação do apoplasto, sendo esta a força motriz da expansão celular em resposta ao hormônio auxina (Dünser e Kleine-Veine, 2015; Perrot-Rechenmann, 2010).

Entretanto, é a vacuolação (capacidade do vacúolo de manutenção da pressão de turgor) que provém o volume necessário para que processo de expansão celular ocorra (Cosgrove, 2000). Desta forma, a atividade das H⁺-ATPases do tipo V e as H⁺-PPases, presentes no tonoplasto, desempenham um importante papel neste processo, a partir do momento em que o gradiente eletroquímico de H⁺, gerados por estas bombas, energizam os transportadores secundários mantendo a pressão osmótica do vacúolo suficientemente alta para a absorção de água (Maeshima et al., 1996; Smart et al., 1998; Zandonadi et al., 2007).

A hipótese deste trabalho é que a bactéria promotora do crescimento vegetal *H. seropedicae* modula as bombas de prótons, induzindo ativações sincrônicas da H⁺-PPases e da H⁺-ATPases de membrana plasmática, estimulando absorção de nutrientes e promovendo outras alterações fisiológicas, favorecendo o crescimento destas plantas.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação de plantas de arroz (*Oryza sativa*) com a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* sobre a ecofisiologia, bioenergética e ionoma destas plantas.

2.2 *Objetivos específicos*

Avaliar a nutrição mineral das plantas de arroz inoculadas com *H. seropedicae*;

Determinar a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática e vacuolar, além da H⁺-PPase vacuolar em plantas de arroz inoculadas com *H. seropedicae*;

Elucidar se as bombas de prótons participam dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal induzido pela bactéria endofítica diazotrófica *H. seropedicae*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O cultivo do arroz

Acredita-se que a espécie *Oryza sativa* teve origem no supercontinente Gondwana a mais de 150 milhões de anos atrás e com a separação dos continentes se espalhou para África, Ásia, Europa e Américas (Khush, 1997). A domesticação para uso alimentício provavelmente aconteceu na Ásia a 9 mil anos, sendo depois introduzido na Grécia onde se popularizou (Santos et al., 2006). No Brasil, dados históricos indicam a domesticação pelos índios de uma espécie de arroz cultivado em solos alagados, o qual chamavam de milho d'agua (EMBRAPA, 2005).

A espécie *Oryza sativa* pertence à família *poaceae*, subfamília *oryzodea*, tribo *oryzoeae*, gênero *oriza*. Sendo as subespécies Indica e Japônica as mais importantes para cultivo (Moreira e Kluge, 1999, Santos et al., 2006).

3.2 Importância social e econômica

Os países da Ásia são os principais produtores. A China, Índia e Indonésia são os líderes na produção, contudo, como na maioria dos países produtores, mais de 90% da produção é destinada ao consumo interno. Assim, a Tailândia lidera o ranking de exportadores, vendendo cerca de 50% da sua produção (USDA, 2012).

O arroz, depois do milho, é o cereal mais produzido no mundo. O cultivo mundial de arroz utiliza, em média, de 150 milhões de hectares para alimentar cerca de 2,5 bilhões de pessoas, o que significa mais da metade da população mundial. Graças ao baixo custo de produção e alto valor nutricional, o cereal se tornou a base da dieta das famílias nos países subdesenvolvidos, emergentes e de grande densidade demográfica, como os asiáticos e o Brasil (EMBRAPA, 2005; FAO, 2009).

Dos países produtores, o Brasil ocupa a 8ª colocação no ranking e o maior produtor entre os países não asiáticos, com uma produção média de 12 milhões de toneladas/ano, produção suficiente para atender apenas ao mercado interno. Contudo, estudos indicam que, como o crescimento da produtividade não é equivalente ao crescimento populacional, a produção até o ano de 2020 não atenderá a crescente demanda (MAPA, 2010; IBGE, 2014).

3.3 Necessidades nutricionais e de cultivo

No país, a cultura encontra condições favoráveis de solo e clima na região sul. Estes fatores, aliados a altos investimentos em manejo e a disponibilidade de água, fazem da região a maior produtora do cereal no país, com o predomínio dos cultivos irrigado e inundado (Khush, 1997; Pinheiro et al., 2006). Já nas demais regiões, onde a restrição hídrica é maior, a principal variedade é a de sequeiro, todavia, a indisponibilidade de água, as altas temperaturas e a baixa fertilidade diminuem a produtividade e aumenta os gastos com fertilizantes (EMBRAPA, 2010).

O estado do Rio Grande do Sul produz cerca de 50% da produção nacional, seguido pelo estado do Mato Grosso, entretanto, neste estado, como nos demais da região centro-oeste, o cultivo é o de terras altas, sob irrigação. Assim, nos estados fora da região sul o estresse hídrico e os solos pobres são os principais limitadores da produção. A submissão as condições adversas de estresse hídrico e nutricional leva a planta a uma série de transformações morfológicas, bioquímicas e moleculares que afetam o seu desenvolvimento, crescimento, reprodução e produtividade (Mahajan e Tuteja, 2005).

A forma do cultivo do arroz influencia na disponibilidade de N. Quando o cultivo acontece em solos inundados, por exemplo, parte do N disponível no solo pode ser perdido por desnitrificação ou lixiviação, aumentando a necessidade dos fertilizantes nitrogenados ou a dependência da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Quando o arroz é do tipo irrigado, o N é rapidamente absorvido pelas plantas, mais, ainda assim existem perdas por desnitrificação. (Reddy e Patrick, 1979; Smil, 1997; EMBRAPA, 2010).

3.4 Fixação biológica de nitrogênio e o arroz

Bactérias endofíticas diazotróficas, fixadoras de nitrogênio, que vivem nos espaços intercelulares, tecido vascular, aerênquima e células mortas do arroz são a esperança de pesquisadores para diminuir a dependência da planta aos insumos e aumentar a produtividade. Os genes expressos por estas bactérias que codificam a nitrogenase indicam que estes microrganismos vivem intimamente nos tecidos da planta, em simbiose, fazendo a fixação do N₂ (James, 2000).

Nas espécies de arroz selvagens existem maiores probabilidades de encontrar populações únicas de bactérias fixadoras de nitrogênio, diferentes das

espécies encontradas nas variedades colonizadas, produzidas de forma comercial (Elbeltagy, 2001). Nas espécies nativas, os endófitos, responsáveis pela fixação de nitrogênio, são encontrados em maior quantidade nas hastes, demonstrando que este possivelmente é o local mais indicado para fornecer o nicho das bactérias diazotróficas. Entretanto, a *H. seropedicae* coloniza principalmente as regiões sub-epidérmicas das raízes (Elbeltagy, 2001).

Estudos indicam que a associação destas bactérias com o arroz pode substituir uma média de 40 kg de N.ha⁻¹, dependendo da variedade de arroz utilizada, e se apenas 25% do total de fertilizantes fossem substituídos pela FBN, geraria uma economia próxima a 400 milhões dos 10 bilhões de dólares gastos anualmente com nitrogênio mineral (Baldani et al., 2002 e Ferreira et al., 2003).

3.5 Interações entre os microrganismos da rizosfera e a planta

Todos os organismos que habitam o planeta exercem algum tipo de interação com indivíduos de outras espécies, podendo ser na forma simbiótica, patogênica ou associativa (Smith e Read, 2008; Begon et al, 2007).

A interação simbiótica ocorre quando ambas as espécies são igualmente beneficiadas com relação, como a interação entre as rizobactérias e as leguminosas onde as bactérias se abrigam em nódulos feitos nas raízes das plantas e a planta recebe o nitrogênio fixado pelo micro-organismo (Rufini et al., 2011).

Já, na interação associativa apenas o microrganismo é beneficiado. O hospedeiro serve de abrigo ao microrganismo, sem nenhum prejuízo aparente. Existem também casos de associação em que o benefício do microrganismo ao hospedeiro é inferior ao que ele recebe. Este fenômeno é pouco conhecido nas relações bactérias/plantas, mas, sabe ser esta a forma em que as bactérias diazotróficas e as gramíneas se relacionam. O microrganismo infecta a planta e troca com ela os nutrientes necessários para completar o seu ciclo de vida (Amaral, 2014).

Entretanto, quando existe dano ao hospedeiro denominamos a interação como patogênica. Isto é comum nas relações em que algumas bactérias infectam os vegetais e utilizam suas substâncias para se desenvolver. A princípio o vegetal resiste a interação, ao identificar um sinal de invasão a planta ativa um mecanismo de defesa, que pode variar de acordo com o tipo de ameaça, podendo ser: a morte da célula infectada, o reforço da estrutura do sítio da infecção, a produção de

proteínas, metabólitos antimicrobianos ou a indução da expressão de genes de defesa (Abramovitch et al., 2006). Mas, como nem sempre estes mecanismos são eficientes, é necessário o auxílio de outros parceiros simbiotes.

3.6 Bactérias Promotoras De Crescimento Vegetal – BPCV

As bactérias que interagem com a planta como simbiose ou associação são chamadas de bactérias promotoras de crescimento vegetal – BPCV (Rodriguez e Fraga, 1999). Elas estimulam a formação e o desenvolvimento das raízes laterais que, mais desenvolvidas, melhoram a absorção de nutrientes e de água, favorecendo a produção de hormônios como a giberelina e auxina, citocinina, ácido indolacético, oligoelementos e sideróforos. (Dimkpa et al., 2009; Khan et al., 2009; Lugtenberg e Kamilova, 2009; Hussain e Hasnain, 2011; Loaces et al., 2011; Patel, 2012; Lugtenberg et al., 2013).

Contudo, a FBN é o principal benefício das BPCVs às plantas. Praticamente todo o nitrogênio existente no planeta encontra-se no estado não disponível ao vegetal, sendo as bactérias responsáveis por transformar o nitrogênio atmosférico em uma forma acessível aos demais organismos. (Lindermann e Glover, 2003).

3.7 Mecanismo de ação das bactérias promotoras de crescimento vegetal

Os efeitos da ação das BPCVs afetam a planta na forma direta ou indireta. Promoção direta acontece quando os compostos produzidos pela bactéria auxiliam a nutrição do vegetal, como a FBN, ou quando os mecanismos de ação do microrganismo facilitam a entrada de nutrientes na planta, como os sideróforos e os fitormônios (Bar-Ness et al., 1992; Bastián et al., 1998; Glick et al., 1999). A promoção indireta refere-se aos mecanismos que estimulam a resistência da planta ou que a auxilia na competição interespecífica, como os antibióticos, etilenos endógenos ou produtos antagônicos a fitopatogênicos que diminuem o stress da planta (Glick, 1995; Miethke e Marahiel, 2007; Ahmad et al., 2008; Araújo et al., 2010; Loaces et al., 2011; Pérez-Montaña et al., 2013).

As BPCVs mais conhecidas são as rizobactérias, elas são eficientes em colonizar a superfície radicular principalmente das leguminosas, produzindo moléculas de sinalização que atuam como mensageiros químicos, fundamentais na

regulação do desenvolvimento da planta (Martinez-Viveros et al., 2010 e Geetha e Sanket, 2013). No interior das raízes, as rizobactérias são capazes de sobreviver, multiplicar e competir com outros microrganismos por um tempo necessário para beneficiar o vegetal, para isto, utilizam vários mecanismos fisiológicos, que podem estar ativos ao mesmo tempo ou individualmente em diferentes estágios do crescimento das plantas (Ahemad e Khan, 2010).

3.8 Interação entre as endobactérias diazotróficas e as plantas

As endobactérias diazotróficas possuem maior eficiência na interação com as gramíneas, elas podem ser encontradas nas raízes, folhas e caule, fornecendo ao vegetal: metabólitos nitrogenados, fitormônios e antibióticos (Rodriguez e Fraga, 1999).

Apesar das rizobactérias serem mais eficientes na fixação de nitrogênio, as bactérias endofíticas são as únicas que conseguem colonizar e sobreviver no interior das raízes sem causar prejuízo a planta e sem competir com a ela por nutrientes, como acontece com os demais microrganismos que habitam a rizosfera (Hallmann et al., 1997; Azevedo, 1998).

São várias as formas de dispersão e infecção das bactérias ao hospedeiro, sendo mais comuns elas serem espalhadas pelo vento, ligados a partícula do solo, na poeira, flutuando na água ou ligadas a equipamentos de manejo Sturz et al, 2000).

Na infecção, a bactéria identifica os sinais provenientes dos exudatos das raízes e penetra na planta pelas fendas da epiderme, pelos pontos de emergência das raízes secundárias, nos ferimentos, nos estômatos e nos espaços intracelulares. Através destas vias elas chegam ao xilema, onde é transportada para várias partes do tecido vegetal, colonizando em especial o caule e as folhas (Olivares et al., 1996; James, 2000, 2002; Roncato-Maccari et al., 2003; Monteiro et al., 2012; Santoyoa et al., 2015).

Devido a uma série de benefícios ao vegetal, cada vez é mais frequente o uso de bionoculantes que possuem em suas fórmulas pelo menos uma estirpe de BPCV como um recurso promissor na produção vegetal, seja como biofertilizantes, bioestimulantes ou bioprotetores (Bashan, 1998; Amorin e Melo, 2002).

3.9 Endobactérias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*, família *Oxalobacteraceae*. O gênero possui 11 espécies: *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. huttiense*, *H. hiltneri*, *H. autotrophicum*, *H. rhizosphaerae*, *H. aquaticum*, *H. chlorophenolicum* e *H. massiliense*. As espécies *H. soli*, *H. canariensis*, *H. aurantiacum* e *H. psychotolerans* foram reclassificadas como *Noviherbaspirillum* (Lin et al., 2013).

A *H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa do grupo das endobactérias diazotróficas, isoladas principalmente do milho e do arroz, mas com potencial de interação com um grande número de plantas, principalmente por não competirem com elas por nutrientes e por transferirem de forma mais eficiente os compostos nitrogenados (Neves et al., 1985; Baldani et al., 1986; Dobereiner, 1995). A associação com um hospedeiro é essencial para a sobrevivência da bactéria, sendo considerado endofítica obrigatória, já, que sua sobrevivência no solo sem a presença de um hospedeiro é muito baixa (Baldani et al., 1987),

Além da fixação de nitrogênio, a *H. seropedicae* produz fitormônios, como o ácido indo-3acético (AIA) e a auxina, que melhoram o desenvolvimento da planta e aos microrganismos patogênicos pela ativação do sistema imunológico inato do vegetal (Bastian et al., 1998; Pedrosa et al., 2011; Yasuda et al., 2009).

O potencial da *H. seropedicae* em melhorar o desempenho do vegetal, faz aumentar o interesse de cientistas, ambientalistas e agrônomos nas propriedades destas bactérias, seja pelo carácter ecológico ou biotecnológico (Baldani et al., 2002; Elbeltagy et al., 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Material Vegetal e local de execução*

As sementes de arroz (*Oryza sativa*) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Sementes da UENF. As sementes foram desinfestadas com álcool 70% por 03 minutos e com hipoclorito a 2% por 05 minutos. Em seguida, foram lavadas com água destilada e postas para germinar em vasos com areia lavada e esterilizada por dois ciclos em autoclave a temperatura de 120°C por uma hora. Posteriormente, as bandejas foram levadas a câmara de crescimento para germinar.

Os experimentos foram realizados em condições de casa-de-vegetação e laboratório do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada no Município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (21°44'47" S e 41°18'24" W e 10 m de altitude).

4.2 *Preparo do substrato, germinação das sementes e plantio*

O substrato para o plantio das mudas foi preparado com areia e latossolo vermelho-amarelo distrófico do horizonte C, na proporção de 2:1 (areia:solo). A areia foi esterilizada conforme descrito acima e o substrato final acondicionado em vasos de polietileno pretos com capacidade de 1 L.

Durante o período da germinação (15 dias) monitorou-se a umidade do substrato, irrigando periodicamente. Após a germinação, as plântulas foram selecionadas por número de folhas e tamanho, e transferidas para vasos contendo o substrato preparado. Semanalmente, adicionou-se 50 mL de solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) modificada, ¼ da força, e o pH ajustado para 5,5.

4.3 *Material biológico e inoculação*

A estirpe da bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54, utilizada neste trabalho foi obtida da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF, cedida gentilmente pelo Dr. Fábio Lopes Olivares.

A bactéria *H. seropedicae* foi inoculada no plantio e após 30 dias efetuou-se um re-inoculação das plantas de *Oryza sativa* seguindo o protocolo de inoculação descrito por Baldotto et al., (2011).

4.4 Isolamento de membrana

A preparação da fração microssomal de raízes de arroz foram realizadas por centrifugação diferencial, como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), modificado por (Façanha e de Meis, 1995; Ramos, 2008). As amostras de tecidos frescos de raízes (10g) foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração gelado contendo 250mM de sacarose, 10 % de glicerol (m:v), 0,5 % de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,2 % de BSA (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 8,0. As soluções estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM de DTT (ditiotretol) e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). A manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como as centrifugações, tiveram a temperatura controlada a fim de que não excedesse 4°C. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado e submetido à centrifugação a 1500xg durante 15 minutos para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10000xg por 15 minutos, para o isolamento das mitocôndrias. Estas organelas foram separadas e descartadas a fim de não interferirem nos experimentos futuros. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação, agora a 100.000 g por 40 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado fração microssomal, foi ressolubilizado em 1 mL de solução tampão (meio de ressuspensão: glicerol 15 % (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6, EGTA 1 mM) e imediatamente congelados. A dosagem de proteína contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

4.5 Hidrólise do ATP

Para mensurar a atividade da ATPase utilizou-se o método da liberação de Pi, durante a hidrólise do ATP ou Ppi, por calorimetria, método de Fiske e Subbarrow (1925). O meio de reação consiste de: MOPS-Tris pH 6,5, pra P-H+

ATPase e pH 7,0 para V-H⁺-ATPase 50 mM; MgCl₂ 5 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM.L⁻¹ e 0,03 mg.mL/L de proteína microsomal. Para atividade pirofosfatásica procederá somente substituição do tampão que passou a ser MOPS-Tris pH 7,0 e o substrato PPI 0,1 mM. Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺ - ATPase foi medida a 35 °C, com ou sem o inibidor das respectivas proteínas, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase do tipo P, V ou Pirofosfatase.

4.6 Indicadores de Crescimento Vegetal

Após 120 dias da inoculação da germinação foram determinados, a altura das plantas, o diâmetro da base do caule e o peso da massa seca da parte aérea. Para a obtenção da altura, foi medido, por meio de uma régua milimétrica, a base da planta até o ápice da folha mais ereta. O diâmetro do caule foi verificado na base do caule, próximo ao substrato, com o auxílio de um paquímetro. Já, no peso da massa seca, a parte aérea, separada da raiz, foi lavada por duas vezes, primeiro em água corrente e depois em água deionizada e colocadas para secar em estufa de ventilação forçada a 70°C. Após 72 horas foram pesadas para obtenção das medidas de massa seca.

4.7 Avaliação Nutricional

Após a determinação da massa da matéria seca, toda a parte aérea das plantas foi macerada em almofariz e acondicionadas em recipiente plástico para análise química. Os teores dos macronutrientes, foram verificados de acordo com Sarruge e Haag (1974). O N foi determinado após digestão sulfúrica conforme Kjeldahl, utilizando-se um destilador e posterior titulação das amostras seguindo a marcha analítica descrita por Martins e Reissmann (2007). Após a digestão via seca, em mufla a 500 °C e solubilização em HCl 3M (Martins e Reissmann, 2007) os minerais foram identificados sendo: o P determinado por colorimetria com vanadato-molibdato de amônio, o K por fotometria de chama e Ca, Mg, S foram então determinados por espectrofotometria de absorção atômica.

4.8 Análise Estatística

O experimento foi realizado em um delineamento experimental inteiramente casualizado constando de dois tratamentos (Controle não inoculado e inoculado com *H. seropedicae*) com 4 repetições. Os dados de todas as análises foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), e a diferença entre os tratamentos foi aferida através do Teste t de *Student* a um nível de 5% de probabilidade

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros de crescimento

A interação *O. sativa* e a bactéria diazotrófica endofítica *H. seropedicae* influenciou significativamente a média das alturas das plantas. Aos 120 dias, plantas inoculadas com a *H. seropedicae* apresentaram um incremento médio na altura de 36% quando comparado às plantas controles (Figura 1).

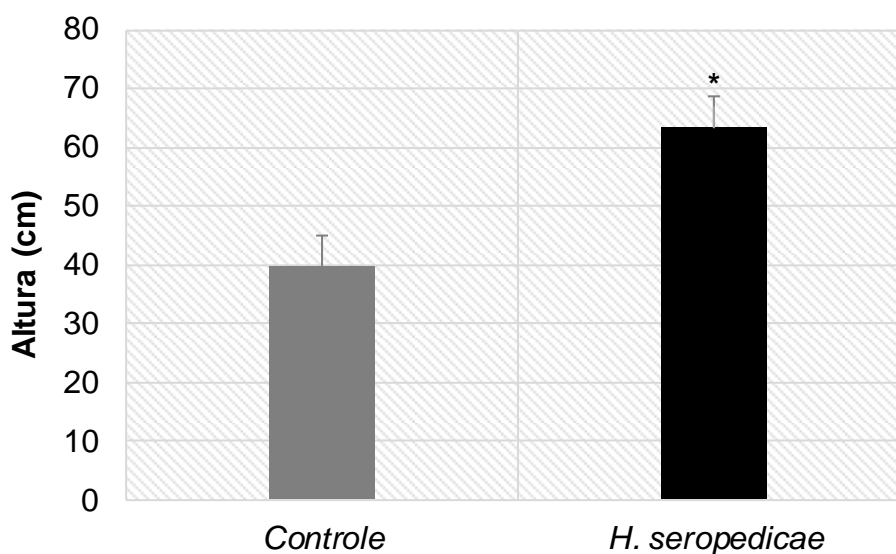


Figura 1. Altura das plantas de *Oryza sativa* aos 120 dias após a inoculação com a bactéria diazotrófica endofítica *H. seropedicae* HRC54. * Diferença significativa pelo Teste t - Student a 5% de probabilidade.

A matéria seca da parte aérea e o diâmetro do caule apresentaram um comportamento semelhante aos obtidos na altura, ou seja, um incremento de 40 e 65%, respectivamente, em plantas inoculadas com *H. seropedicae* HRC 54 (Figura 2, 3).

Estes resultados corroboram com os encontrados por outros autores (Baldani et al., 2000; Gyaneshwar et al., 2002; James et al., 2002; Muthukumarasamy et al., 2006) e especula-se que seja devido ao efeito bioestimulante do endófito pela produção de compostos como o ácido indol-acético (AIA) (Radwan et al., 2004).

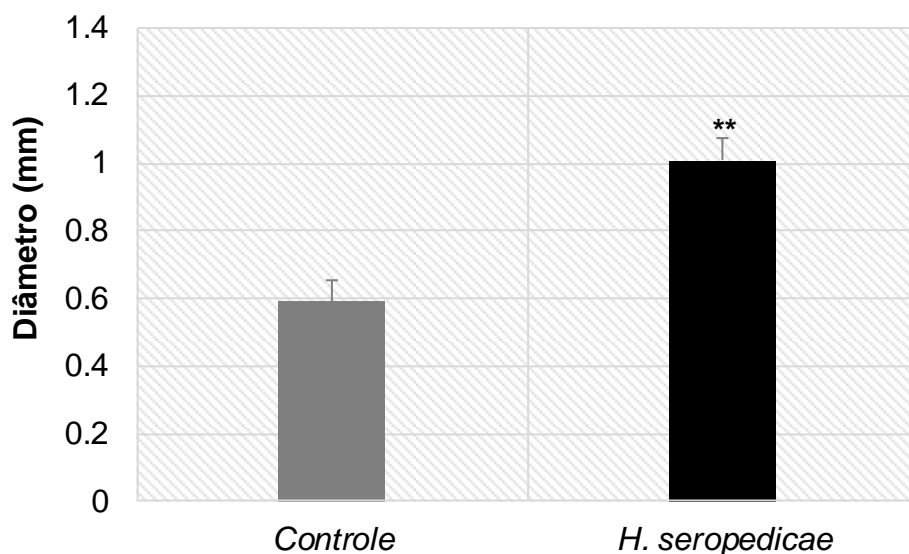


Figura 2. Diâmetro do caule de plantas de *O. sativa* após 120 dias de inoculadas com a estirpe de *H. seropedicae* e o controle. * Diferença significativa pelo Teste t - Student a 5% de probabilidade.

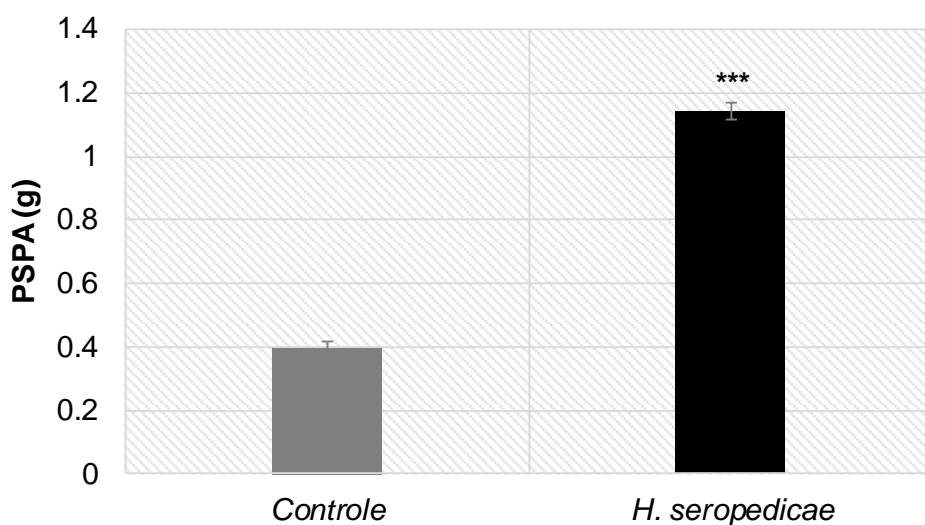


Figura 3. Peso da matéria seca da parte aérea de plantas de *O. sativa* aos 120 dias após a inoculação com a bactéria diazotrófica endofítica *H. seropedicae* HRC54. * Diferença significativa pelo Teste t - Student a 5% de probabilidade.

O aumento na produção do AIA também foi sugerido por Duangpaeng et al. (2012) e Souza et al. (2013) como relação crescimento de gramíneas inoculadas com a bactéria. Tais autores confirmam o que o incremento nos parâmetros de crescimento de plantas de arroz inoculadas com a bactéria *H.*

seropedicae se deve a maior fixação de nitrogênio e produção de compostos indólicos e sideróforos translocados às hospedeiras.

Estes resultados corroboram com os encontrados por outros autores (Baldani et al., 2000; Gyaneshwar et al., 2002; James et al., 2002; Muthukumarasamy et al., 2006) e especula-se que seja devido ao efeito bioestimulante do endófito pela produção de compostos como o ácido indol-acético (AIA) (Radwan et al., 2004). O aumento na produção do AIA também foi sugerido por Duangpaeng et al., (2012) e Souza et al., (2013) como relação crescimento de gramíneas inoculadas com a bactéria. Tais autores confirmam o que o incremento nos parâmetros de crescimento de plantas de arroz inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* se deve a maior fixação de nitrogênio e produção de compostos indólicos e sideróforos translocados às hospedeiras.

Alguns estudos comprovaram que aplicação de *H. seropedicae* em arroz aumenta a produção, o peso e rendimento dos grãos (Schmid et al., 2006; Ferreira et al., 2013). Ferreira et al. (2013) testaram estirpes de *Herbaspirillum* em tratamento com arroz irrigado na forma turfosa e observaram um ganho significativo de massa seca quando comparado ao arroz não inoculado. Os ganhos da produção de grãos nas plantas inoculadas com *Herbaspirillum* sp. foram semelhantes àquelas submetidas à adubação nitrogenada.

Sabino (2007) estudando a inoculação de bactérias do gênero *Herbaspirillum* em gramíneas encontrou que todos os tratamentos inoculados apresentaram acúmulo de biomassa seca superior ao controle não inoculado. Similarmente, mais de 60% dos experimentos realizados por Guimarães et al., (2007), com a inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas, apresentaram incrementos significativos no peso da massa seca das plantas. Sharma et al. (2014) testando o crescimento de mudas de arroz inoculados com diversas espécies de BPCVs, também observaram maior massa seca da parte aérea da planta em relação ao controle.

5.2 Bombas de prótons

A resposta da atividade enzimática da H⁺-ATPase da membrana plasmática isoladas raízes de *O. sativa* inoculadas ou não com a bactéria *H. seropedicae* não foi significativa quando comparada ao controle (Figura 4A). Por outro lado, a atividade da H⁺-ATPase da membrana vacuolar apresentou uma

ativação de 90% quando comparado ao controle (Figura 4B). Uma resposta similar à da H⁺-ATPase do tipo V foi observado na atividade da H⁺-PPase vacuolar (Figura 4C).

A H⁺-ATPase de membrana plasmática é a principal bomba de prótons responsável pelo transporte de íons e moléculas para o interior da célula através de um gradiente eletroquímico transmembrana. Esta função, além de estar relacionada ao crescimento da planta, aumenta a tolerância do vegetal a estresses ambientais. Contudo, a atividade da bomba não é constante e pode ser desativada por sinais externos como intensidade luminosa, hormônios da planta (Sze et al., 1999).

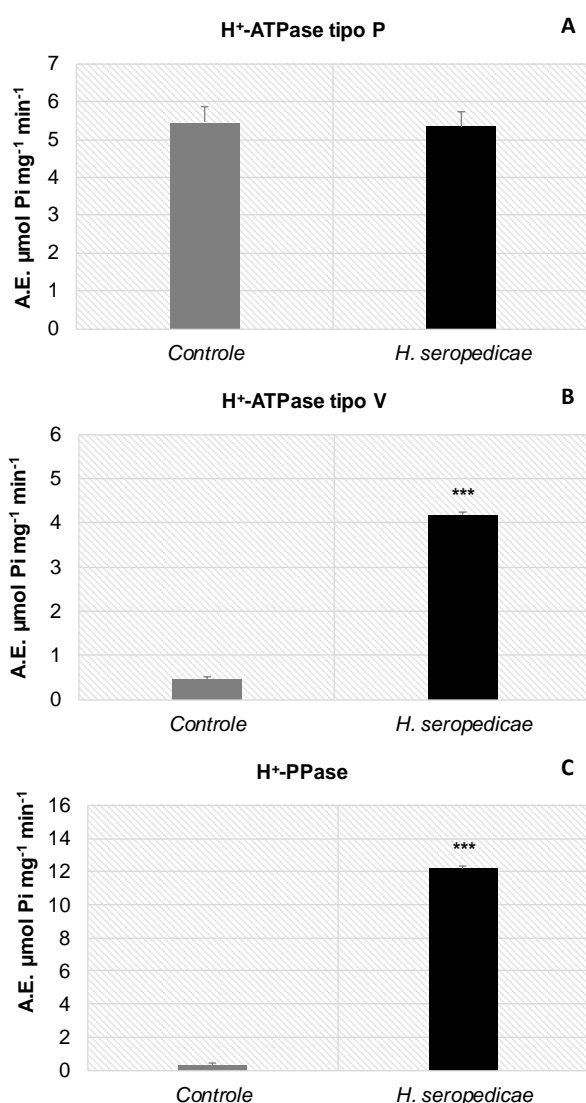


Figura 4. Atividade enzimática específica (A.E.) das Bombas de Prótons. Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase de membrana plasmática (A) e vacuolar (B), e da H⁺-Pirofosfatase vacuolar (C) foram mensuradas colorimetricamente pela liberação de Pi na fração microssomal de raízes de *Oryza sativa*, aos 120 dias após a inoculação com a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* HRC54. *Diferença significativa pelo Teste t - Student a 0,1% de probabilidade.

H⁺-ATPase vacuolar e a H⁺-PPase bombeiam prótons para o interior do vacúolo, gerando uma força próton-motora através da membrana do tonoplasto gerando uma diferença de potencial eletroquímico que permite o transporte de solutos importantes para o metabolismo da planta, como os macronutrientes Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ (Ramos et al., 2011).

Este resultado explica, em parte, a maior concentração dos macronutrientes, Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ nas plantas com a estirpe da *H. seropedicae* (Figuras 5C, 5D e 5E). Ademais, a H⁺-PPase auxilia no transporte de fitohormônios e é ativada sob condições de estresse, assim contribuindo para o crescimento do vegetal (LI et al., 2005; Gaxiola et al., 2007).

5.3 Acumulação de nutrientes na parte aérea

Todos os macronutrientes analisados apresentaram incrementos significativos na parte aérea de plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 (Figura 5).

Quando comparado ao tratamento não inoculado, plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 apresentaram um incremento de 120 % no conteúdo de nitrogênio (Figura 5A). Plantas de *O. sativa* inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram um acréscimo médio de 350% de P, uma concentração de 1,8 mg planta⁻¹ contra 0,4 mg planta⁻¹ do controle (Figura 5B). O conteúdo de potássio (K) em plantas inoculadas foi 440% superior ao controle (Figura 5C), enquanto de Cálcio (Ca) foi 150% (Figura 5D), magnésio (Mg) de 96% (Figura 5E) e Enxofre (S) de 300% (Figura 5F).

O nitrogênio é o principal nutriente responsável pelo crescimento vegetal na maioria das plantas cultivadas. Ele pode ser fornecido por fontes industriais ou pela fixação biológica. Bactérias promotoras do crescimento do gênero *Herbaspirillum*, possuem a enzima hidrogenase, capaz de converter o azoto atmosférico amoníaco em compostos orgânicos que, após convertido em ureídeos são rapidamente transportados e metabolizados pelo vegetal, promovendo seu crescimento (Rusmanaa et al., 2015).

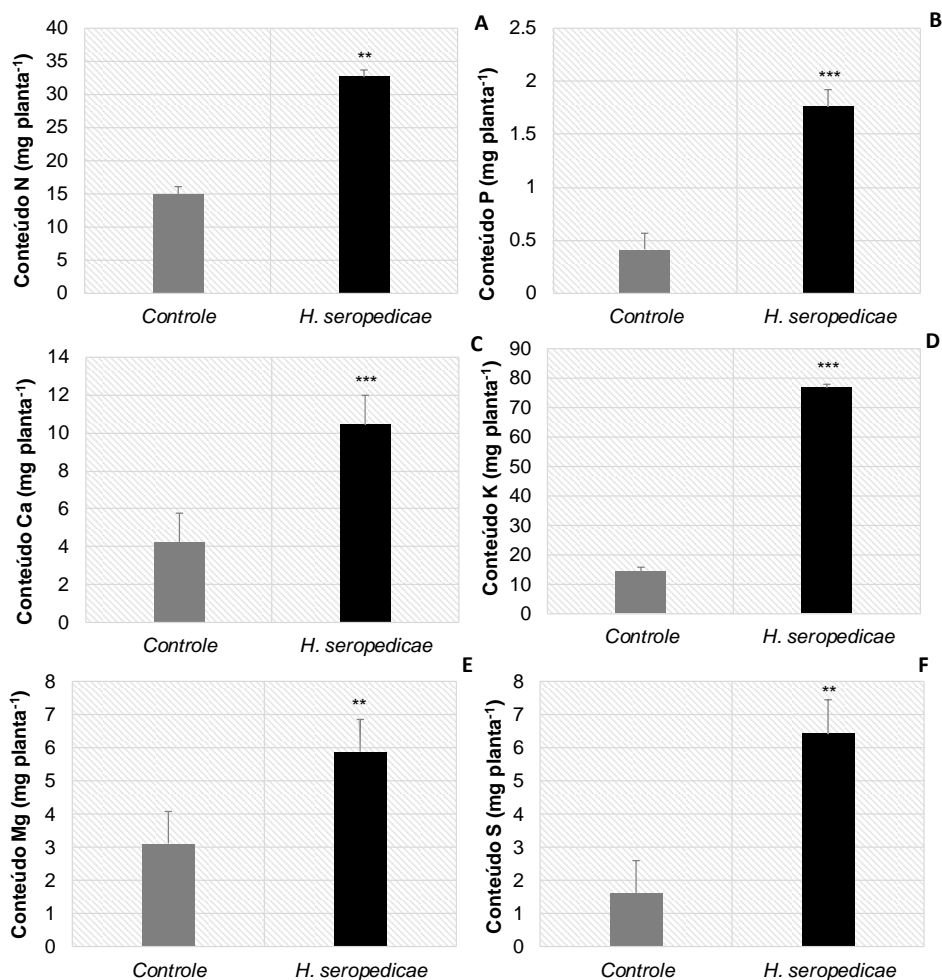


Figura 5. Conteúdo de macronutrientes na parte aérea de plantas de *O. sativa* aos 120 dias após a inoculação com a bactéria diazotrófica endofítica *H. seropedicae* HRC54. ** Diferença significativa pelo Teste t - Student a 1% de probabilidade e *** a 0.1%.

De fato, Roncato-Maccari, et al. (2003) observaram que as plantas da família das gramíneas, quando inoculadas com estirpes de *H. seropedicae* apresentam a expressão do gene *nif* nos tecidos. A expressão dos genes *nif* nas bactérias diazotróficas determina o sucesso da fixação biológica em gramíneas como o arroz (Prakamhanga et al., 2009).

Bactérias endofíticas diazotróficas se diferenciam das demais BPCVs, pelo fato de em condições de escassez de nutrientes não competirem com as plantas por nutrientes (Prakamhanga et al., 2009).

6 CONCLUSÕES

- A interação da bactéria endofítica diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* com plantas de *Oryza sativa* ativou a atividade enzimática das H⁺-ATPase da membrana plasmática e do vacúolo;
- A maior atividade das H⁺-PPases nas plantas inoculadas correlacionou com a maior assimilação de macronutrientes;
- Ecologicamente, a interação *Oryza sativa*-*Herbaspirillum seropedicae* é positiva e o endófito induz alterações significativas no hospedeiro proporcionando um maior crescimento e absorção de nutrientes via ativação das bombas de prótons.

7 REFERÊNCIAS

- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB (2006). Bacterial elicitation and evasion of Bradford AMM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.7 2 p. 248-254
- Ahemada M, Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. of King Saud Univ. Sci.* 26. 1–20.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173–81. doi: 10.1016/j.micres.2006.04.001
- Amaral, FP (2014) Interação de bactérias benéficas associativas (*Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*) com diferentes espécies de gramíneas (*Zea mays*, *Brachypodium distachyon* e *Setaria viridis*). Tese - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Amorim, EPR, Melo IS (2002) Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora* parasítica e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, n.2, p.565-568.
- Araújo AES, Rossetto CAV, Baldani VLD, Baldani JI (2010) Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. *Ciência e Agrotecnologia* 34:932–939. doi: 10.1590/S1413-70542010000400019
- Ashraf MA, Rasool M, Mirza MS (2011) Nitrogen Fixation and Indole Acetic Acid Production Potential of Bacteria Isolated from Rhizosphere of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). 5:348–355.
- Azevedo J (1998) Microrganismos endofíticos. *Ecol. microbiana* 117–137.
- Babalola OO (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–70. doi: 10.1007/s10529-010-0347-0
- Baldani JI, Reis VRS.; Teixeira KRS, Baldani VLD. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL (2002) *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. EDUCS, Caxias do Sul, 2002, 433p.
- Baldani VLD, Alvarez MAB, Baldani JI, Döbereiner, J (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil*, 90:35-46.
- Baldani VLD, Oliveira E, Balota E, Baldani JI, Kirchhof G, Döbereiner J (1997) *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. *An. Acad. Bras. Ci.*, 69:116.

- Baldotto MA, Muniz RC, Baldotto LEB, Dobbss LB (2011) Root growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. treated with humic acids isolated from typical soils of Rio de Janeiro state, Brazil. *Revista Ceres*, 58:504-511.
- Bar-Ness E, Hadar Y, Shanzer A, Libman J (1992). Iron uptake by plants from microbial siderophores. A study with 7-nitrobenz-2 oxa-1,3-diazole-desferrioxamine
- Barney AG, Min-Hyung R, Florence M, Amaya GC, John WP, Christopher AV, Philip P (2015). Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. *Current Opinion in Biotechnology* Volume 32, Pages 216–222.
- Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16:729–770. doi: 10.1016/S0734-9750(98)00003-2
- Bastian F, Rapparini F, Baraldi R, Piccoli P, Bottini R (1998) Inoculation with *Acetobacter diazotrophicus* increases glucose and fructose content in shoots of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Symbiosis*, v.27, p.147-156.
- Begon M (2008) *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. Michael Bergon, Colin R. Townsend e John L. Harper. Porto Alegre, Art.med.4ª edição.
- Clark, J.(1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.23, p.458-460, 1975
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009) Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* 32:1682–94. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x
- Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI.(1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, EMBRAPA-SPI e Seropédica, EMBRAPA-CNPAB.
- Duangpaeng A; Phetcharat P, Chanthapho S, Boonkantong N. Okuda, N.(2012)The Study and Development of Endophytic Bacteria for Enhancing Organic Rice Growth. *Procedia Engineering*Vol. 32, Pages 172–176.
- Elbeltagy A, Nishiok K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui Hi, e Minamisawa K (2001). Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species.. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Nov; 67(11): 5285–5293.
- EMBRAPA (2005). *Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil: sistema de produção 3*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).
- EMBRAPA (2010). *Arvore do conhecimento: arroz – Coreção do solo e adubação*. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fojvokoc02wyiv80bhgp5p7b35z48.html>
- EMBRAPA, 2005. *Cultivo do Arroz Irrigado* <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>

- FAO – Food And Agriculture Organization Of The United Nations (2009). Disponível em <http://www.fao.org>.
- Ferreira JS, Sabino DCC, Guimarães SL, Baldani JI, Baldani VLD (2003) Seleção de veículos para inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Revista Agronomia, UFRRJ*, v. 37, n. 2, p. 6-12.
- Ferreira JS, Guimarães SL, Baldani VLD (2011) Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. *Enciclopédia Biosfera*. V7, n 13, p 826-833.
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007) Plant Proton Pumps. *FEBS Letters*, 581: 2204-2214
- Geetha SJ, Sanket JJ (2013) Engineering Rhizobial Bioinoculants: A Strategy to Improve Iron Nutrition. *The Scientific World Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/315890>.
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117. doi: 10.1139/m95-015
- Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications. *Scientifica (Cairo)* 2012:15. doi: 10.6064/2012/963401
- Guimarães SL, Baldani JI, Baldani VLD e Jacob-Neto J (2007) Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n.3, p. 393-398.
- Gustavo Santoyoa, Gabriel Moreno-Hagelsiebb, Ma. del Carmen Orozco-Mosquedac, Bernard R. Glickc (2015) Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes, *Microbiological Research*. doi:10.1016/j.micres.2015.11.008
- Gyaneshwar P, James EK, Reddy PM, Ladha JK (2002) *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium - tolerant rice varieties. *New Phytologist*, v. 154, p. 131- 145.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43:895–914. doi: 10.1139/m97-131
- Hussain A; Hasnain S (2011) Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. *World Journal of Microbiology Biotechnology*.2645-2654.
- IBGE (2014) 1 – Produção Agrícola [tp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_2014](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_2014)
- James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* Volume 65, Issues 2–3, March 2000, Pages 197–209)
- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio WL, Reddy PM, Iannetta PP, Olivares FL, Ladha JK (2002). Infection and colonization of rice seedlings by

- the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact.* Sep;15(9):894-906.
- Janpen P, Kiwamu M, Kamonluck T, Nantakorn B, Neung T (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) *Applied Soil Ecology* Volume 42, Issue 2, Pages 141–149
- Baldani JI, Baldani VLD (2000) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77 (3), 549-579
- Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SMS, Rasheed M (2009). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. Biol. Sci.* 1, 48 e 58.
- Khan Z, Doty SL. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant and soil.* 322:197-207.
- Khush GS (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol Biol.* Sep;35(1-2):25-34. Disponivel: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9291957>
- Kloepper JW (1994) Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: Okon, Y. (Ed.), *Azospirillum/Plant Associations*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 111–118.
- Lauren D.B Roncato-Maccaria, Humberto J.O Ramosa, Fabio O Pedrosaa, Yedo Alquinib, Leda S Chubatsua, Marshall G Yatesa, Liu U Rigoa, Maria Berenice R Steffensa, Emanuel M Souzaa, (2003). Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology.* Volume 45, Issue 1, 1 July 2003, Pages 39–47
- Li CY, Strzelczyk E (2000) Belowground microbial processes underpin forest productivity. *Phyt - Ann Rei Bot* 40:129–134.
- Li, B.; Pattenden, S.G.; Lee, D.; Gutierrez, J.; Chen, J.; Seidel, C.; Gerton, J.; Workman, J.L. (2005) Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci*, 102:18385–18390.
- Lin SY1, Hameed A, Arun AB, Liu YC, Hsu YH, Lai WA, Rekha PD, Young CC.(2013) Description of *Noviherbaspirillum malthae* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil, and proposal to reclassify *Herbaspirillum soli*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum canariense* and *Herbaspirillum psychrotolerans* as *Noviherbaspirillum soli* comb. nov., *Noviherbaspirillum aurantiacum* comb. nov., *Noviherbaspirillum canariense* comb. nov. and *Noviherbaspirillum psychrotolerans* comb. nov. based on polyphasic analysis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Nov;63(Pt 11):4100-7. doi: 10.1099/ijs.0.048231-0.
- Lindermann WC, Glover CR (2003) Nitrogen fixation by legumes. Cooperative Extension Service – College of Agriculture and home Economics. Guide A-129, may 2003, 4p.

- Loaces I, Ferrando L, Scavino AF (2011) Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb Ecol* 61:606–18. doi: 10.1007/s00248-010-9780-9.
- Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg G V (2013) Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:373–383. doi: 10.1023/A:1020596903142
- Mahajan, S., and Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 139–158.
- Mahyarudinaan Rusmanaa, Yulin Lestaria (2015) Metagenomic of actinomycetes based on 16S rRNA and nifH genes in soil and roots of four Indonesian rice cultivars using PCR-DGGE. *HAYATI Journal of Biosciences*. doi:10.1016/j.hjb.2015.10.001
- MAPA (2010) Arroz. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>
- Martínez-Viveros MA, Jorquera DE, Crowley G, Gajardo e Mora MI (2010) O mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10 (3): 293 – 319.
- Martins APL, Reissmann CB (2007) Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. *Sciencia Agraria, Curitiba*, v. 8, n. 1, p. 1-17.
- Michael G Palmgren (2001). Plant Plasma Membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 52: 817-845 (DOI: 10.1146/annurev.arplant.52.1.817
- Michelis, M.I., and Spanswick, R.M. (1986). H⁺-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.* 81 542–547.
- Miethke M, Marahiel MA (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:413–51. doi: 10.1128/MMBR.00012-07
- Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankievicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM (2012). Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil.* 2012;356:175–196.
- Moreira, MF e Kluge, RA (1999) Arroz, In: Castro, PRC ee Kluge, RA (Eds) *Ecofisiologia de cultivos anuais: Trigo, Milho, Soja, Arroz e Mandioca*. São Paulo: Nobel, 1999.
- Neves, M.C.P.; Didonet, A.D.; Duque, F.F.; Öbereiner, J.(1985) Rizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *Journal of Experimental Botany, Oxford*, v. 36, p. 1179 -1192
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils*, v. 21, p. 197-200, 1996.

- Patel PP, Rakhashiya PM, Chudasama KS, Thaker CV (2012) Isolation, Purification and Estimation of Zeatin from *Corynebacterium aurimucosum*. *European Journal of Experimental Biology*.2 :1-8.
- Paula MA, Urquiaga S, Siqueira JO, Dobereiner J (1992) Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biol Fertil Soils* 14:61–66. doi: 10.1007/BF00336304
- Pedrosa FO, Monteiro RA, Wasseem R, Cruz LM et al. (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics* 7: e1002064.
- Pérez-Montaño F, Jiménez-Guerrero I, Contreras Sánchez-Matamoros R, et al (2013) Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Res Microbiol* 164:749–60. doi: 10.1016/j.resmic.2013.04.001
- Pinheiro, BS.; Castro, EM.; Guimaraes, CM. (2006) Sustainability and profiyability aerobio rice production in Brasil. *Field Crops Research*. V 97, p 34.
- Salinas R, Sánchez E, Ruíz JM, Lao MT (2013) Phosphorus levels influence plasma membrane H⁺-ATPase activity and K⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺ assimilation in Green Bean. *Rev. Communications in Soil Science and Plant Analysis* .Volume 44.
- Facanha R, Meis L (1995)Inhibition of Maize Root H⁺-ATPase by Fluoride and Fluoroaluminate Complexes. *Plant Physiology* May 1, 1995 vol. 108 no. 1 241-246
- Radwan TEE, Mohamed ZK, Reis VM (2004) Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* on production of indolic compounds and growth of wheat and rice seedlings. *Pesq. agropec. bras.* [online]. vol.39, n.10, pp. 987-994. ISSN 1678-3921. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004001000006>
- Ramachandran Muthukumarasamy , Munusamy Govindarajan, Muthaiyan Vadivelu, Gopalakrishnan Revathi (2006) N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants *Microbiological Research* 161, pg238—245.
- Ramos, A.C.; Façanha, A.; Palma, L.M.; Okorokov, L.A.; Cruz, Z.M.A.; Silva, A.G.; Siqueira, A.F.; Bertolazi, A.A.; Canton, G.C.; Melo, J.; Santos, W.O.; Schimitberger, V.M.B.; Okorokova-Façanha, A.L.(2011) An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Braz J Plant Physiol*, 23(1):79-89.
- Ravikumar G, Manimaran P, Voleti SR, Subrahmanyam D, . Sundaram RM, Bansal KC, Viraktamath BC, Balachandran SM (2014) Stress-inducible expression of *AtDREB1A* transcription factor greatly improves drought stress tolerance in transgenic indica rice. *Rev. Transgenic Res.* 2014; 23(3): 421–439. doi: 10.1007/s11248-013-9776-6
- Rodríguez H, Fraga R (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv.* (4-5):319-39.

- Rufini M, Ferreira PAA, Soares BL, Oliveira DP, Andrade MJB e Moreira FMS (2011) Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. Rev.embrapa.br > Capa > v.46, n.1,
- Sabino DCC (2007). Interação Planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz. Tese, Universidade Federal rural do Rio de Janeiro.
- Santos AB, Stone LS, Vieira NRA (2006); A cultura do arroz no Brasil, 2º Ed. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.
- Schmid M, Baldani I, Hartmann A (2006).The Genus *Herbaspirillum*. Springer New York, pp.141-150 doi: 10.1007/0-387-30745-1_7 Chapter: 7,
- Sharma A, Shankhdhar D, Sharma A, Shankhdhar SC (2014) Growth promotion of the rice genotypes by pgprs isolated from rice rhizosphere. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2014, 14 (2), 505-517
- Shweta s e kritika s (2015) Study of cyanobacteria as biofertilizer from the rice field. World Journal of Pharmaceutical Research. Volume 4, Issue 3, 1696-1706. Research Article ISSN 2277– 7105
- Siqueira AF, Cruz ZMA, Queiroz S, Rocha OJAM, Soares DNES, Ramos AC (2008) Desvendando a H⁺-Pirofosfatase vacuolar e o seu papel na biotecnologia vegetal. Natureza on line 6 (1): 9-15
- SMIL, V (1997) Abonos nitrogenados. Investigación y Ciencia, n. 09, p. 64 – 70.
- Smith SE, Read D (2008) Mycorrhizal Symbiosis, 3rd edn. Academic Press (Elsevier) London.
- Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R, Passaglia LMP (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. Plant and Soil. Volume 366, Issue 1, pp 585-603 . First online: 21
- Sturz AV, Christie BR, Nowak J (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 19, 1–30.
- Ross T, Nichols DS (2014). Ecology of bacteria and fungi in foods | Influence of Temperature. Encyclopedia of Food Microbiology, 2014, Pages 602–609.
- Taiz, L.; Zeiger, E.(2002) Plant physiology. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p.423-460.
- USDA (2012) Food Assistance Programs to Benefit Nearly 10 Million Worldwide. [s.l.] (United States Department of Agriculture)
- Yasuda ET (1980) The geometric structure of spilanthal. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v.28, n.7, p.2251-3
- Yasuhiro Tsujimoto, Yukiyo Yamamoto, Keiichi Hayashi, Alhassan I. Zakaria, Yahaya Inusah, Tamao Hatta, Mathias Fosu, Jun-Ichi Sakagami(2013) Topographic distribution of the soil total carbon content and sulfur deficiency for rice

cultivation in a floodplain ecosystem of the Northern region of Ghana. *Field Crops Research*, Volume 152, October 2013, Pages 74-82.

Yin X ,Liang X, Zhang R, Yu L, Xu G, Zhou Q, Zhan X (2015).Impact of phenanthrene exposure on activities of nitrate reductase, phosphoenolpyruvate carboxylase, vacuolar H⁺-pyrophosphatase and plasma membrane H⁺-ATPase in roots of soybean, wheat and carrotOriginal. *Environmental and Experimental Botany*, Volume 113, Pages 59-66