



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS II – LAGOA SECA/PB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE GRADUAÇÃO BACHARELADO
EM AGROECOLOGIA**

EMERSON LUCIO GOMES SILVA

**EFICIÊNCIA DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* NO AUMENTO DE
OSMOPROTETORES EM ARROZ VERMELHO SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA.**

LAGOA SECA – PB

14 outubro 2016

EMERSON LUCIO GOMES SILVA

**EFICIÊNCIA DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* NO AUMENTO DE
OSMOPROTETORES EM ARROZ VERMELHO SOB DEFICIÊNCIA HÍDRICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Agroecologia.

Área de concentração: Microbiologia do Solo.

Orientador: Prof. Dr.. Carlos Henrique S. G. Meneses

Coorientador

LAGOA SECA – PB

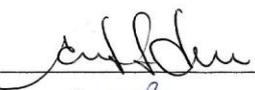
14 outubro 2016

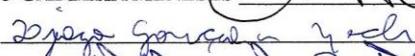


CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
COORDENAÇÃO DO CURSO DE BACHARELADO EM AGROECOLOGIA

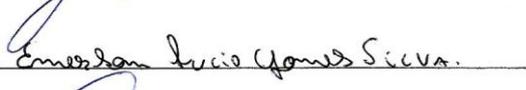
ATA DA DEFESA DO TCC

Aos 14 dias do mês de Outubro de 2016, às 13:30 horas, no Auditório do CCAA, Campus II, da UEPB, foi realizada a defesa pública do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: EFICIÊNCIA DE *Albacorectobacteriazotrophius* NO PIMENTO DE GEMOPROTETORES EM ANOZ VERMELHO POR ATIVIDADE LÍMICA., do educando EMERSON LÚCIO GOMES SILVA, Matrícula 121360172, sob orientação do Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE SALVINO GADÊLHA MENESES, da UEPB. A Banca Examinadora foi composta pelo Prof. Dr. DIOGO GONÇALVES NEDER e pelo Prof. Dr. JOSÉ FÉLIX DE BRITO NETO, ambos os professores da UEPB; e foi presidida pelo Orientador, que deu início aos trabalhos. O educando teve o tempo de 20 minutos para a sua apresentação, e a Banca Examinadora teve igual tempo para as arguições. Encerrada a defesa, a Banca Examinadora, acompanhada do orientador se reuniu para avaliar o Trabalho. Após a análise da Banca Examinadora, foi atribuído o conceito **APROVADO**, com a Nota 8,8 (oitto virgula oito), o qual foi proclamado pela presidência da banca, perante o público presente. A presente ata foi lida e aprovada, por unanimidade, ficando assinada por mim, Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE SALVINO GADÊLHA MENESES, demais membros da Banca Examinadora, Educando e Coordenadora do TCC. Lagoa Seca/PB, 14 de Outubro de 2016.

Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE SALVINO GADÊLHA MENESES 

Prof. Dr. DIOGO GONÇALVES NEDER 

Prof. Dr. JOSÉ FÉLIX DE BRITO NETO 

EMERSON LÚCIO GOMES SILVA 


Élide Barbosa Correa
Coordenadora do TCC

S586e Silva, Emerson Lúcio Gomes
Eficiência *Gluconacetobacter diazotrophicus* no aumento de osmoprotetores em arroz vermelho sob deficiência hídrica. [manuscrito] / Emerson Lúcio Gomes Silva. - 2016.
29 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agroecologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Carlos Henrique S. G. Meneses, Departamento de Biologia".

1. Bactéria endofítica diazotrófica. 2. *Oryza sativa* L. 3. Seca. I. Título.

21. ed. CDD 631.4

Não te mandei eu? Esforça-te, e tem bom
ânimo; não temas, nem te espantes; porque o
Senhor teu Deus é contigo, por onde
quer que andares.

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu grande e verdadeiro pai que me abençoou e me guiou nesses 5 anos de curso e, mesmo quando parecia tudo perdido sua felicidade me susteve. Senhor, foste o principio de tudo, deste-nos a vida e com ela oportunidade e realizar nossos sonhos. Chamou-nos a esta profissão e iluminou nossos caminhos, conduzindo-nos a tal ofício tão abençoado. Estiveste presente nos momentos em que a tristeza, a desilusão e a vontade de desistir se fizeram presentes. Deste-nos mão e nos guiaste, mostrando-nos que os obstáculos são para serem vencidos e que a perseverança deve nos acompanhar em todas as nossas caminhadas. E sentimos tua presença agora, quando nossos corações estão tomados pela alegria, em nossos olhos tomados por lagrimas, que expressam a emoção de mas esta conquista. Nesse momento, Senhor, só temos a agradecer por tudo, pelo sonho realizado, pelas dificuldades superadas, enfim, por uma etapa vencida. Não paramos por aqui. Continuaremos em busca de nossos ideais, sempre guiados pela Tua presença em nossas vidas.

A minha querida noiva Nislaynny Vieira Lacerda, pelo companheirismo e incentivo.

A toda a minha família, Maria das Graças Gomes Silva, José Laildo Silva, Elder Lúcio Gomes Silva, Everton Lúcio Gomes Silva.

Ao meu orientador Professor Dr.. Carlos Henrique S. G. Meneses, pela orientação de todas as etapas de realização desse projeto.

Aos professores Dr.. Diogo Gonçalves Neder e Dr.. José Felix de Brito Neto por aceitar, de bom grado, o convite de participar de minha banca de conclusão de curso, dedicando seu tempo à leitura de meu trabalho de conclusão de curso (TCC), contribuindo assim, par a melhoria do mesmo.

Aos meus companheiros de sala de aula, pelos inúmeros momentos de descontração.

RESUMO

Apesar de ser praticamente desconhecido da maioria da população brasileira, o arroz vermelho vem sendo cultivado principalmente por pequenos agricultores da Região Nordeste do Brasil, tendo grande importância econômica e social. O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal pode ser uma alternativa viável ao auxiliar no desenvolvimento de plantas sob condições de estresse, devido ao estímulo à produção de fitohormônios e fixação biológica de nitrogênio, que atuam no sentido de reduzir os efeitos negativos que o estresse pode causar no desenvolvimento das plantas. Com isso, objetivou-se avaliar os aspectos bioquímicos em plantas de arroz vermelho inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob deficiência hídrica. O Experimento foi realizado com o cultivo de arroz vermelho (genótipo 405 EMBRAPA Meio Norte) inoculado com *G. diazotrophicus* e não inoculado, com e sem condições de restrição hídrica, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com 8 tratamentos e 4 repetições, onde cada parcela foi constituída de um lisímetro contendo 60 plantas. Foram avaliados variáveis de bioquímicas (prolina, Peroxidação de lipídios e glicina betaína). Na restrição hídrica aumentaram os níveis de prolina, glicina betaína e Peroxidação de lipídios e após a reidratação esses valores foram reduzidos nas plantas inoculadas. A inoculação com a bactéria *G. diazotrophicus*, mostrou ser uma potencial ferramenta contra o estresse hídrico em arroz vermelho.

Palavras chave: *Bactéria endofítica diazotrófica, Oryza sativa L., Seca.*

ABSTRACT

Despite being virtually unknown to most of the population, the red rice has been grown mainly by small farmers in the Northeast of Brazil, with great economic and social importance. The use of bacteria that promote plant growth can be a viable alternative to assist in the development of plants under stress conditions due to stimulating the production of phytohormones and biological nitrogen fixation, which act to reduce the negative effects that stress can causing the development of the plants. It aimed to evaluate the biochemical aspects of red rice plants inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* under water stress. The experiment was carried out with the red rice cultivation (405 EMBRAPA Meio Norte genotype) inoculated with *G. diazotrophicus* and not inoculated with and without water restriction, we used a completely randomized design with 8 treatments and 4 replications, where each plot consisted of a lysimeter containing 60 plants. They were assessed biochemical variables (proline, peroxidation of lipids and glycine betaine). In water restriction increased Proline, glycine betaine and peroxidation of lipids and after rehydration these values were reduced in the inoculated plants. The inoculation with bacteria *G. diazotrophicus*, proved to be a potential tool against water stress in red rice.

Key-words: Endophytic diazotrophic bacteria, *Oryza sativa* L., Drought.

SUMARO

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DE LITERATURA	11
OBJETIVOS	13
METODOLOGIA	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

O arroz vermelho foi introduzido no Brasil pelos portugueses no século XVI, entrando pelo atual estado da Bahia, porém ali não obteve grande aceitação, ao contrário do estado do Maranhão nos dois séculos seguintes. Em 1772, por determinação da coroa de Portugal, que só tinha interesse na produção de arroz branco para suprir a metrópole, os agricultores foram proibidos de plantar o arroz vermelho no Maranhão. Por isso, a produção migrou para a região semiárida, onde ainda é encontrado, nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte (PEREIRA, 2002, 2004, apud BARRETO, 2012). O plantio é normalmente realizado por pequenos agricultores, utilizando sementes nativas ou variedades tradicionais selecionadas ao longo do tempo, caracterizadas pela variabilidade, adaptabilidade às condições de cultivo e ampla base genética (BARRETO, 2012).

O arroz vermelho ou arroz da terra como é mais conhecido, é de porte alto, folhas verde-claras, decumbentes e pilosas, colmos finos, alta capacidade de perfilhamento e sementes com pericarpo avermelhado, aristas longas, altas taxas de dormência e debulha natural (FONSECA et al., 2013).

A agroecologia busca avaliar os aspectos ecológicos, socioeconômicos e agronômicos de um ecossistema, procurando mantê-lo sustentável, produtivo e rentável. Suas principais metas são: desenvolvimento de uma agricultura ambientalmente sadia, economicamente viável, socialmente justa e culturalmente aceitável para os usuários de cada região. Exigindo uma visão de conjunto, utilizando conceitos firmes que tragam qualidade de vida as pessoas e ao meio ambiente (PENTEADO, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cultura do arroz vermelho

O arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) pode atender a crescente demanda de alimentos para a população como uma cultura alternativa.

O arroz vermelho na forma de grão tem alto valor nutritivo, enquanto que a sua forragem verde é bastante rica em proteínas (MENEZES et al., 2012). No Nordeste, o arroz é o segundo cereal mais importante depois do milho. A disponibilidade de água desempenha um papel crucial no ciclo de vida da cultura do arroz (PEREIRA et al., 2009). Durante os estádios vegetativos de desenvolvimento, o estresse causado por seca diminui a altura da planta e a sua área foliar (MENEZES et al., 2012). A deficiência de água na floração reduz, de duas a três vezes, o rendimento de grãos (PEDROSO, 1985).

A qualidade fisiológica de sementes é influenciada por diversos fatores durante a produção, os principais são: condições climáticas (temperatura e água), nutrientes e intensidade luminosa (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Dentre os nutrientes, o nitrogênio tem ação mais visível e pronunciada (MARCOS FILHO, 2005).

Para a fixação biológica de nitrogênio, diversos trabalhos de seleção de estirpes (ZILLI et al., 2011) e de novos veículos para formulação de inoculantes foram realizados, e os resultados obtidos auxiliaram na ampliação da área plantada e inoculada (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012; SILVA JÚNIOR et al., 2012). A fixação biológica de nitrogênio além de apresentar baixo custo, reduz a emissão de gases que podem promover o efeito estufa e evita a contaminação dos recursos hídricos (PELEGRIN et al., 2009), pode fornecer, biologicamente, o nitrogênio necessário as leguminosas aumentando suas produtividades, e ainda promovendo uma economia de aproximadamente US\$ 720 milhões por ano (HUNGRIA et al., 2011).

Pela sua habilidade em converter nitrogênio atmosférico em amônia, que pode ser utilizada pela planta, as bactérias diazotróficas também são consideradas promotoras de crescimento vegetal. Em razão de sua capacidade de sobreviver em ambientes deficientes em nitrogênio, as bactérias diazotróficas podem enriquecer seletivamente a rizosfera, local em que habitam como organismos de vida livre ou estão associadas assimbioticamente a plantas (Dobbelaere et al., 2003).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria gram-negativa, pertencente ao filo Proteobacteria, à ordem Rhodospirillales e à família Acetobacteraceae (KERSTERS et al., 2006). Esta família contém três gêneros que possuem a capacidade de fixar N atmosférico, compreendendo sete espécies: *Acetobacter nitrogenifigens*, *Gluconacetobacter kombuchae*, *Gluconacetobacter johannae*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Swaminathania salitolerans* e *Acetobacter peroxydans* (DUTTA; GACHHUI, 2007).

Os processos de infecção e colonização de raízes por *G. diazotrophicus* foram inicialmente estudados em plantas micropropagadas de cana (JAMES et al., 1994; JAMES et al., 2001) e mais tarde em *Arabidopsis* (COCKING et al., 2006) e mais recentemente em plântulas de arroz (MENESES et al., 2011). Apesar da grande quantidade de informações obtidas, os fatores genéticos da bactéria envolvidos no processo de colonização ainda permanecem desconhecidos.

Células de *G. diazotrophicus* podem encontrar ROS não só no solo, mas também durante o estabelecimento da interação com seus hospedeiros vegetais, como cana-de-açúcar e arroz (MENESES, 2011). Esta interação começa com trocas de sinal complexas entre plantas e parceiros bacterianos. Flavonóides produzidos em plantas iniciam a transcrição dos genes bacterianos e a consequente produção bacteriana de exopolissacarídeos, que estimulam a adesão das bactérias sobre a raiz. Além disso, o exopolissacarídeo produzido por *G. diazotrophicus*, é necessário para a colonização bacteriana bem sucedida de tecido do hospedeiro por meio de processos de infecção sobre as plantas.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a mitigação da deficiência hídrica em plantas de arroz vermelho durante a fase reprodutiva, inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Objetivos Específicos

Mensurar reações bioquímicas presentes no arroz vermelho sob restrição hídrica em condições de inoculação com *G. diazotrophicus*;

Foram avaliados os efeitos dos tratamentos de inoculação no arroz, em função do manejo de deficiência hídrica em termos ecofisiológicos e produtivos;

4. METODOLOGIA

Caracterização da área experimento

O presente trabalho foi realizado no Viveiro de mudas da UEPB (Figura 1), localizado nas seguintes coordenadas: 07° 12' 42,99'' de latitude Sul, 35° 54' 36,27'' longitude Oeste, 521 metros altitude, no Laboratório de Ecofisiologia de plantas cultivadas, ECOLAB, localizados no CAMPUS I, em Campina Grande – PB, e no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, no período compreendido entre os meses de outubro de 2014 à maio de 2015.



Figura 1. Visão da área experimental, Campina Grande/PB, 2015.

Características climáticas

A cidade de Campina Grande tem clima do tipo Aw'i, segundo a classificação climática de Köppen, considerado como seco sub-úmido. O período chuvoso está situado entre os meses de março a julho com precipitação pluviométrica em torno de 800 mm (1974-2004). A temperatura máxima média anual é de 28,7 °C e a mínima de 19,8°C variando pouco ao longo do ano (SOUSA JÚNIOR, 2006).

Características edáficas

O solo utilizado foi coletado nos primeiros 20 cm do horizonte A de um solo franco-arenoso, proveniente do município de Esperança-PB. Foram feitas as análises químicas no

Laboratório de Solos da UFCG, cujas características estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores da análise química do solo da área experimental do Viveiro de mudas da UEPB. Campina Grande/PB, 2015. *Resultado abaixo de 5mg dm⁻³

pH em H ₂ O	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	N	M.O.
	cmol _c dm ⁻³				mg dm ⁻³		%	
5,10	0,00	2,30	1,50	0,70	*	31,00	0,12	1,69

Fatores em estudo e tratamentos

O experimento foi realizado com o cultivo de arroz vermelho (*Oryza sativa L.*) constando de duas condições de inoculação com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* (I1= sementes não inoculadas e I2= sementes inoculadas), um genótipo (405 Embrapa Meio Norte) em plantas com diferentes condições de restrição hídrica, sendo U1= 30-35%; U2= 50-55%; U3= 70-75% e U4= 100% da capacidade de campo. Utilizando delineamento inteiramente casualizados, em um fatorial 2x4, sendo 8 tratamentos com 4 repetições, onde cada parcela foi constituída de um lisímetro de drenagem, e semeadas 70 sementes por lisímetro, após germinadas foi feito um desbaste totalizando 60 plantas por parcela.

Os lisímetros apresentam 100 cm de comprimento, 50 cm de largura e 50 cm de profundidade, instalando-se na base um sistema de drenagem por meio de tubulação e registro; foram tratados com um impermeabilizante Tecryl D3 (para evitar eventuais infiltrações e vazamentos dos lisímetros) (Figura 2) preenchidos com uma camada de 5 cm de brita, mais 5 cm de areia grossa e preenchendo-se o restante com material de solo franco-arenoso.



Figura 2. Lisímetros tratados com um impermeabilizante Tecryl D3 (para evitar eventuais infiltrações e vazamentos dos lisímetros) e preenchidos com uma camada de 5 cm de brita.

A irrigação foi realizada a partir da semeadura, mantendo-se a umidade do solo próximo à capacidade de campo. Quando as plantas estavam na fase R3 (emissão das panículas), foram coletadas amostras de solo, diariamente, e medidos os potenciais hídrico do solo por psicrometria, utilizando o Dewpoint Potentia Meter (WP4-T), associada a uma curva de retenção de água no solo (figura 3), e determinando a quantidade de água repostada ao dia em cada nível de restrição hídrica, até a expansão dos grãos, maior quantidade de grãos alongados R6 (grãos leitosos)

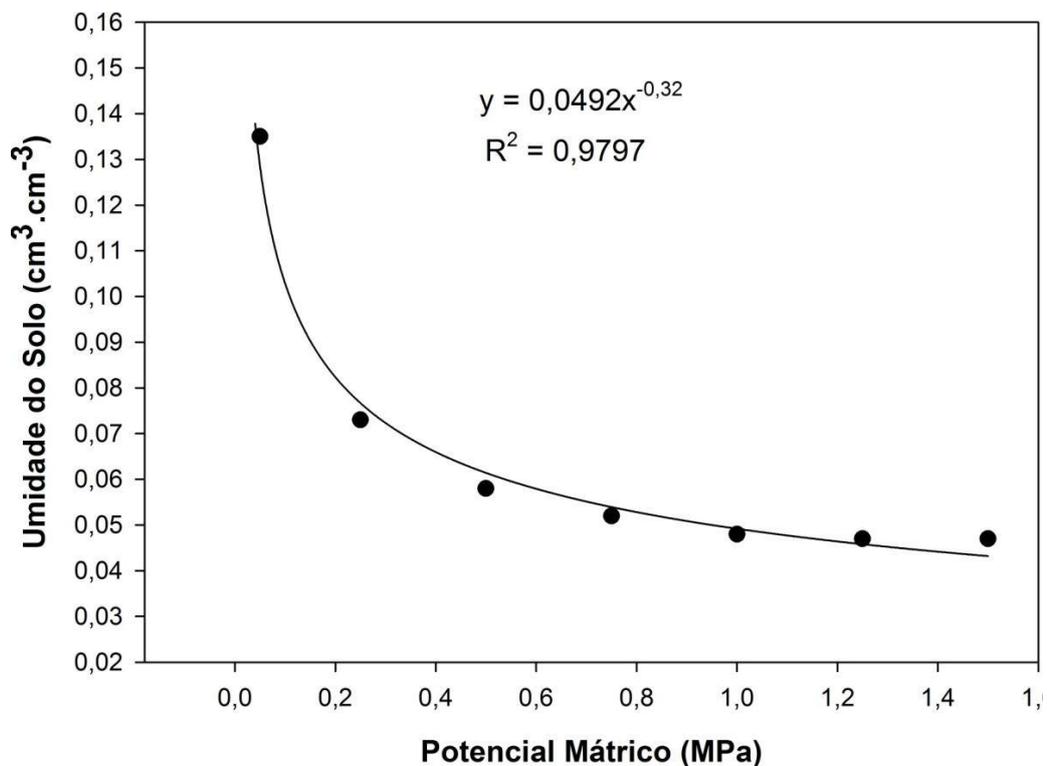


Figura 3. Curva de retenção de água no solo, EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica – RJ.

Adicionalmente, após o regime de restrição hídrica (15 dias) as plantas foram irrigadas normalmente, tendo sido analisadas também 1 (uma) hora após a reidratação.

Processo de Inoculação

Na inoculação, foi utilizada uma estirpe selecionada de *G. diazotrophicus* pela suas características de solubilizar fósforo in vitro, produção de AIA e redução de acetileno: *G. diazotrophicus* PAL5. A estirpe foi reativada em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio DYGS (2 g de glicose; 1,5 g de Peptona; 2 g de extrato de levedura; 0,5 g de

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; para 1L, pH 6,8 (RODRIGUEZ NETO et al., 1986), a 30°C sob agitação a 150 rpm por 48 horas. Em seguida foi semeada em placas com meio semi- específico, LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995). Após a verificação da pureza, a estirpe foi multiplicada em tubos contendo meio DYGS nas condições citadas anteriormente. As células foram lavadas com solução salina e a densidade óptica (em 600 nm) foi ajustada para 0,9 – 1,5 ml, onde logo após esta ressuspensão bacteriana foi utilizada para inocular em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml do meio DYGS a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 48 horas. O número de células viáveis foi determinado pelo método de microgota, no respectivo meio para cada bactéria (SPENCER e RAGOUT, 2001). 15 ml do caldo bacteriano foi adicionados em sacos de polipropileno contendo 35 g de turfa para produzir o inoculante utilizado. Em seguida, foi homogeneizado e incubado a 30 °C por um período de 24 horas (fase de maturação).

As sementes de arroz foram umedecidas com água estéril e misturadas com a turfa numa proporção de 250 g de inoculante para cada 20 kg de sementes de arroz (FERREIRA, 2004), (5 g de turfa, 150 g de sementes e 10 ml do meio). Em seguida as sementes inoculadas foram colocadas para secar à sombra.

Semeadura

A semeadura foi realizada em Fevereiro/2014, com 70 sementes por lisímetro, distribuídos em duas filas na profundidade de 3 cm, deixando-se apenas 60 plântulas por lisímetro, realizando-se o desbaste 3 dias após germinação.

Tratos culturais

Os tratos culturais constaram de controle de plantas daninhas (tiririca) manualmente, na medida em que surgia no interior dos lisímetros às plantas invasoras. Não foram observados a ocorrência de doenças em todo o período do experimento, mas constatou-se uma praga do tipo lagarta, sendo necessário fazer uma aplicação do inseticida SUMIDAN, com uma dosagem de 5ml pra 8 litros, conforme a orientação do fabricante.

Adubação

A adubação foi realizada com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), como fonte de Nitrogênio (N), 18 gramas dividido em duas aplicações, a primeira foi após a germinação, e a segunda aplicação foi antes do estresse hídrico, no surgimento das panículas, diluído em água,

baseando-se nos dados da análise de amostras do solo, quantidades recomendadas para cultivo de arroz (VELOSO et al., 2009). A utilização de outros nutrientes não foram necessário, devido o solo já disponibilizar dessa suplementação, sendo este bastante rico em matéria orgânica.

Período de coleta do material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada depois de 15 dias que as plantas estavam sob estresse hídrico, na fase reprodutiva. Foram coletadas duas folhas por repetição, com auxílio de luvas, tesoura e envolvidas em papel alumínio, em seguida, postas no gelo e imediatamente encaminhadas para um freezer à -80°C, para conservá-las. Uma hora após reidratar todas as parcelas, foram coletadas novas amostras para serem feitas análises e compará-las com as plantas no estresse, seguindo o mesmo procedimento.

Controle de qualidade do inoculante utilizado

Foi realizada uma contagem do número mais provável (NMP) das células do inoculante e da população aderida às sementes de acordo com (DÖBEREINER et al., 1995).

Estimativa do número mais provável (NMP) nas raízes e a nas folhas. Foi utilizada a técnica do NMP, também de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995). A contagem foi feita na época do estabelecimento do estresse. Foram trituradas 5 g de raiz e folhas, separadamente, lavadas no liquidificador, na presença de 45 ml de água destilada estéril e em seguida foram diluídos seriadamente até 10⁻⁶. Logo após, 100µl dos 4 extratos mais diluídas foram colocados em frascos com 5 ml dos meios LGI-P. A contagem foi realizada após 7 dias de incubação.

Variáveis em estudo Teor de Prolina

O teor de prolina foi determinado utilizando-se o método de Bates et al. (1973). Para a realização do teste colorimétrico, pipetaram-se alíquotas de 1,0 mL do extrato bruto; 1,0 mL de ninhidrina ácida; 1,0 mL de ácido acético glacial. Após banho-maria fervente por 60 min., resfriaram-se os frascos e efetuou-se leitura do composto colorido a 520 nm, com o auxílio do espectrofotômetro de microplaca da Multiskan GO - Thermo Scientific. Como referência, foi utilizada uma reta padrão com L-prolina.

Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi avaliada estimando-se o teor de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso em equivalentes de aldeído malônico, MDA (CAKMAK e HORST, 1991). A extração foi realizada pela homogeneização de amostras foliares em 4mL de ácido tricloroacético 0,1% (p/v) e o homogenato será centrifugado a 15.000 g, por 15 min, a 4°C. Os tubos foram fortemente agitados e incubados a 90°C, por 20 min. A reação foi paralisada em banho de gelo e a mistura clarificada por centrifugação a 13.000 g, por 8 min a 4°C. Em seguida, a absorvância (ABS) da amostra foi registrada a 532 nm em um espectrofotômetro (de microplaca da Multiskan GO - Thermo Scientific) e a ABS inespecífica (a 600 nm) descontada.

Glicina betaína

A Glicina betaína foi determinada segundo o método de Grieve e Grattan (1983). As amostras serão maceradas em 2 mL de água destilada sob agitação constante, à temperatura ambiente, por um período de 4 horas, seguindo de centrifugação a 3.500 g por 10 minutos, a 25 °C. O sobrenadante foi coletado e dele retirado uma alíquota de 250 µL para a quantificação de glicina betaína. Para isso, 250 µL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados a cada amostra, seguindo de incubação em banho de gelo por 1 hora. Após esse tempo, 200 µL de iodeto de potássio (a aproximadamente 8°C) foram adicionados e a mistura incubada por 16 horas a 0 °C. As amostras foram centrifugadas a 3.500 g, por 15 minutos a 0 °C, e o resíduo coletado. Em seguida, lavado por duas vezes em 2 mL de ácido sulfúrico 1 N (a aproximadamente 8 °C) e após centrifugação a 3.500 g, por 5 minutos a 0 °C, o precipitado foi dissolvido em 3 mL de 1,2-dicloroetano, por meio de agitação vigorosa. Após 2,5 horas de repouso, a ABS das amostras foi obtida a 365 nm, com o auxílio do espectrofotômetro de microplaca da Multiskan GO - Thermo Scientific, e para os cálculos sendo utilizada uma curva padrão de glicina betaína. Os resultados foram expressos em mg glicina betaína g⁻¹ MS.

Análises estatísticas

Os dados das variáveis respostas serão submetidos à análise de variância pelo teste F, e comparando-se as médias por meio do teste *t* e do teste de Tukey a 5% de significância utilizando-se do programa SIGMAPLOT (2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Controle de qualidade do inoculante utilizado

A contagem do número de células viáveis presentes no inoculante mostrou uma população acima de 10^8 g^{-1} e a ausência de contaminantes (Tabela 2). Alguns trabalhos realizados na Embrapa Agrobiologia, com o intuito de selecionar o veículo de inoculação utilizando as estirpes *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. mostraram que, o número de células viáveis se mantém acima de 10^8 g^{-1} por um período de até 180 dias após a produção (FERREIRA, 2004). Bashan (1998) recomenda que a população no inoculante seja superior a 10^8 células g^{-1} para se obter uma inoculação bem sucedida. Por outro lado, a contagem do número de células presentes nas sementes peletizadas mostrou uma população ao redor de 10^9 células g^{-1} na semente. É importante introduzir no solo um número suficiente de células para garantir uma população com a capacidade de competir com os microorganismos nativos e sobreviver às condições adversas no solo.

Tabela 2. Contagem realizada no inoculante produzido e nas sementes inoculadas com a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5, utilizada no experimento. Campina Grande/PB, 2015.

Tratamentos	Meios de cultura	Log do nº células g^{-1}		
		Inoculante	Semente inoculada	Semente não inoculada
PAL5	LGI-P*	9,65	9,30	N.D.

Meio LGI-P (semi seletivo para *Gluconacetobacter* spp.). N.D. (Não detectada).

Estimativa do número mais provável (NMP) nas raízes e nas folhas

A análise sobre o número de bactérias diazotróficas presentes nas raízes e folhas lavadas, avaliadas durante o estágio de desenvolvimento reprodutivo, mostrou a presença de bactérias diazotróficas em todos os tratamentos inoculados, porém não sendo detectadas nos tratamentos controle (não inoculados) (Tabela 3). Em todos os tratamentos inoculados se verificaram concentrações de *G. diazotrophicus* PAL5 maiores que 10^5 UFC g^{-1} . Punschke et al. (2005), encontraram resultados similares quando quantificaram bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz cultivadas no Uruguai, onde 69% das amostras de raízes apresentaram concentrações maiores que 10^5 UFC g^{-1} . Por outro lado, Sabino (2007) não

encontrou diferença no número de células entre os tratamentos inoculados com *B. brasilense* e *H. seropedicae* e os não inoculados em plantas de arroz avaliadas nos estádios de florescimento e maturação de grãos.

Dentre os microorganismos com capacidade de fixar nitrogênio existem diferentes procariotos, como arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Dentro da microbiota do solo, particularmente na rizosfera, está uma grande parte das bactérias diazotróficas (WAKELIN et al., 2009). Baldani (1996) sugere que em sistemas com solo, o controle não inoculado possui populações nativas de bactérias diazotróficas que alcançam o mesmo número que as inoculadas. Estes resultados mostram que as populações submetidas às mesmas condições tendem a estabilizar-se no solo. No entanto a presença de bactérias diazotróficas não necessariamente significa que a planta se beneficie da FBN ou outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

Foi observada diferença na população de bactérias entre os tecidos de arroz vermelho coletados sob as condições testadas (Tabela 3). Rouws et al. (2010) também não encontraram uma tendência definida a respeito do comportamento das estirpes *H. seropedicae* ZAE94, *S. azotifigens* e *S. trueperi* testadas durante o ciclo da cultivar de arroz BRS Talento. Experimentos de inoculação de arroz com e sem adubação nitrogenada mostraram que o número de bactérias diminuiu com a idade da planta, atingindo o equilíbrio no estágio de maturação, o que corresponde à fase final do ciclo da cultura (BALDANI, 1996; FERREIRA, 2004).

Tabela 3. Estimativa do número mais provável ($\text{Log do n}^\circ \text{ células g}^{-1}$) de *G. diazotrophicus* PAL5 presentes nas raízes e folhas de plantas de arroz vermelho. Coletadas nas fases de desenvolvimento vegetativo. Campina Grande/PB, 2015.

Tratamento	Meio de Cultura	Reprodutivo	
		Raízes	Folhas
Não inoculado	LGI-P**	N.D.	N.D.
PAL5	LGI-P**	$5.44 \pm 0.24^*$	$5.36 \pm$

* Média \pm desvio padrão (n=3), ** Meio LGI-P (semi seletivo para *Gluconacetobacter* spp.).

N.D. (Não detectada).

No estudo dos fatores de diferentes condições de restrição hídrica (100%, 70%, 50% e 30% da capacidade de campo) e as condições de inoculação (com e sem inoculação) do arroz

vermelho 405 Embrapa meio norte influenciaram, significativamente, nos resultados das variáveis estudadas (crescimento, ecofisiológicas, bioquímicas e produtivas) nas avaliações sob estresse de 15 dias, analisados a 1% de probabilidade.

Análises bioquímicas

Acúmulo de malondialdeído (MDA)

O acúmulo de malondialdeído (MDA) na peroxidação lipídica sofreu influência conforme se diminuía a porcentagem de água no solo e no decorrer que aumentava o nível de estresse hídrico tanto no arroz vermelho inoculado e não inoculado com *G. diazotrophicus* (Figura 4), verificando uma maior quantidade de MDA no arroz não inoculado, principalmente a 30% de capacidade de campo.

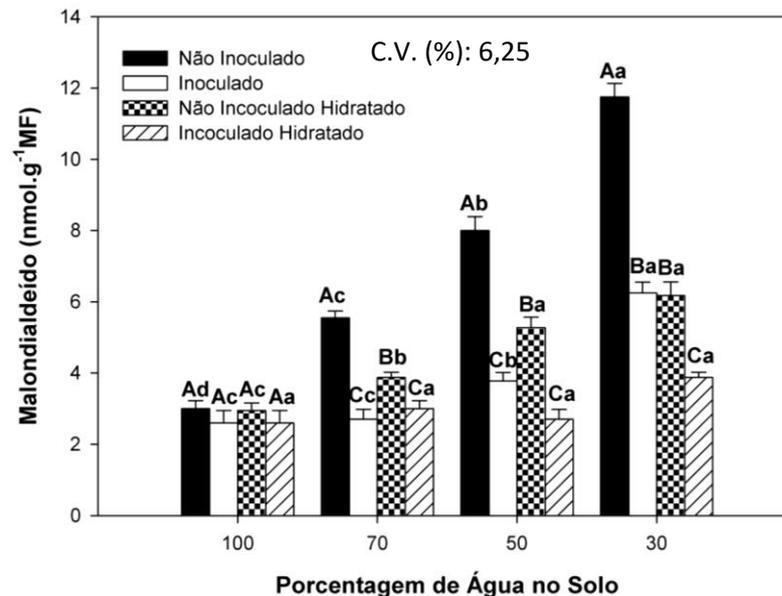


Figura 4. Acúmulo de malondialdeído em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação em cada porcentagem de água do solo) e médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (porcentagens de água do solo). C.V.(%): Coeficiente de variação.

Observou-se ainda diferença significativa entre os tratamentos 100%, 70%, 50% e 30% de capacidade de campo, nas plantas inoculadas e não inoculadas, e após sofrer o processo de reidratação. Constatou-se que, quando o arroz vermelho encontrava-se em

condição de 100% de capacidade de campo não houve diferença significativa entre os fatores inoculado, não inoculado, inoculado hidratado e não inoculado hidratado em relação a quantidade de MDA nas células, isso mostra que a peroxidação de lipídios nas membranas biológicas é o sintoma mais evidente de estresse oxidativo em plantas. Aos 70%, 50% e 30% de porcentagem de água no solo teve aumento na concentração de MDA no arroz não inoculado em relação ao tratamento controle, 100%, já em plantas inoculadas houve um decréscimo, indicando que a presença da bactéria na planta modifica o teor de MDA, ou seja, é produzido em menor quantidade, corroborando também os resultados observados após a reidratação principalmente em 30% de restrição hídrica.

Teor de prolina

Analisando a figura 5, nota-se que houve diferença significativa entre os tratamentos de estresse hídrico, 100%, 70%, 50% e 30%, em seus respectivos fatores, quando não inoculado e inoculado, nos teores de prolina. Por outro lado, não se diferenciando entre si nos tratamentos de 100% e 70% da capacidade de campo para o arroz não inoculado. Observou-se também, que não houve diferença significativa entre os tratamentos após as plantas serem reidratadas mesmo quando inoculado e não inoculado.

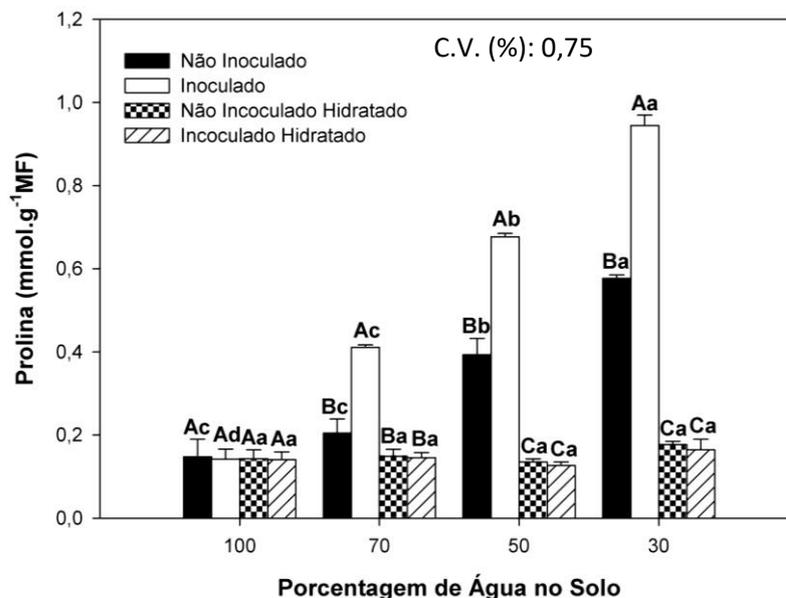


Figura 5. Teor de prolina ($\text{mmol.g}^{-1}\text{MF}$) em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias

seguidas de *letras maiúsculas iguais*, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação em cada porcentagem de água do solo) e médias seguidas de *letras minúsculas iguais*, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (porcentagens de água do solo). C.V.(%): Coeficiente de variação.

Houve aumento linear na atividade do teor de prolina no genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação (Figura 5). A ação desse osmorregulador foi mais intensificada quando as plantas passaram por um déficit hídrico maior, com 30% de capacidade de campo, tanto as não inoculadas como inoculadas, com o aumento gradativo na capacidade de campo, sendo o conteúdo desse aminoácido reduzido quando a disponibilidade hídrica do solo foi aumentada, por outro lado, não se diferenciando entre si nos tratamentos de 100% e 70% da capacidade de campo para o arroz não inoculado.

Constatou-se que a bactéria talvez tenha influenciado o aumento da produção de prolina quando as plantas passavam por estresse hídrico, principalmente nos níveis mais elevados como 30%, 50% e 70% de CC.

Observou-se ainda que, quando o arroz vermelho encontrava-se na situação de 100% de capacidade de campo não houve diferença significativa entre os fatores inoculado, não inoculado, inoculado hidratado e não inoculado hidratado. No entanto, houve diferença significativa entre os fatores inoculado, não inoculado, inoculado hidratado e não inoculado hidratado para 70% da capacidade de campo, havendo insignificância para não inoculado, não inoculado hidratado e inoculados hidratado (Figura 5). Estando a planta em 50% e 30% da capacidade de campo, verificou-se diferença entre inoculado e não inoculado, não inoculado hidratado e inoculado hidratado, não havendo diferença significativa entre inoculado hidratado e não inoculado hidratado, evidenciando que o acúmulo deste aminoácido nas plantas está relacionado com a quantidade de água disponível no solo.

Glicina betaína

Com relação à atividade da glicina betaína, observou-se acúmulo com aumento da restrição hídrica nas plantas de arroz vermelho principalmente com 30% de CC (Figura 6), isso aconteceu para as plantas inoculadas e não inoculadas com *G. diazotrophicus*, talvez tenha sido devido que, a síntese da glicina betaína é desencadeada a partir da falta de água no meio celular.

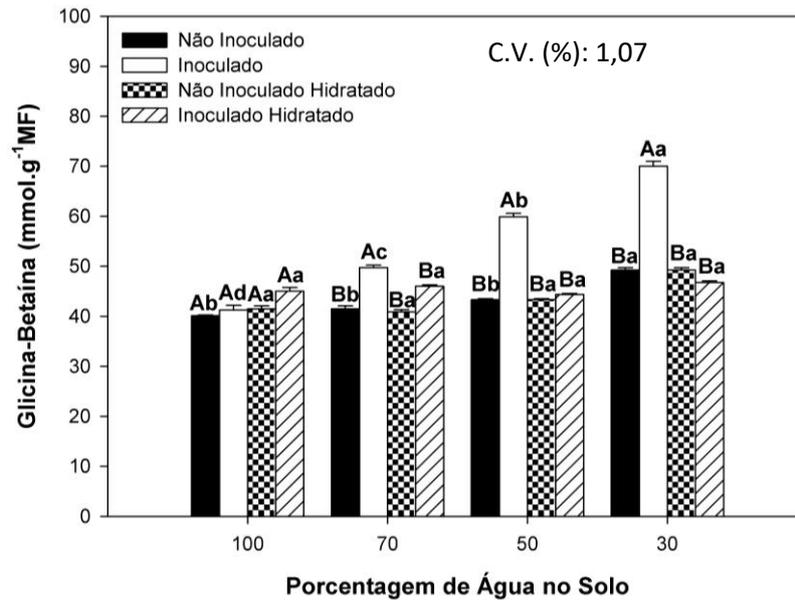


Figura 6. Teor de glicina betaína ($\text{mmol.g}^{-1}\text{MF}$) em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação em cada porcentagem de água do solo) e médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (porcentagens de água do solo). C.V.(%): Coeficiente de variação.

As plantas não inoculadas principalmente aos níveis de 100%, 70% e 50% de CC não se diferenciaram estatisticamente, comparando com as inoculadas o conteúdo deste osmoprotetor foi reduzido quando a disponibilidade hídrica do solo foi aumentada (Figura 6). Já que a glicina betaína é um composto que pode desempenhar proteção eficaz contra o estresse, podendo ser acumulativa e não tóxica para a planta, além de equilibrar a diferença osmótica em torno da célula e do citosol, atua também como o protetor das membranas dos tilacóides que faz com que mantenha a eficiência da fotossíntese.

Constatou-se que, com o aumento de estresse hídrico se obteve uma maior absorção de glicina betaína nas plantas inoculadas, diferindo estatisticamente dos não inoculados, inoculados hidratados e não inoculados hidratados. No entanto, após uma hora da reidratação das plantas de arroz vermelho foi possível observar que houve uma estabilização no teor de glicina betaína tanto nas plantas inoculadas e não inoculadas com *G. diazotrophicus*, havendo assim uma proteção na estrutura celular na planta (Figura 6). Conclui-se então que a bactéria possa ter exportado glicina betaína para a planta, já que alguns microrganismos como a própria *G. diazotrophicus* tem a capacidade de estimular o

crescimento com a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, aumento da produtividade.

Observou-se também que não houve diferença significativa nos tratamentos após as plantas serem reidratadas mesmo quando inoculado e não inoculado (Figura 6).

CONCLUSÕES

A inoculação com a bactéria *G. diazotrophicus*, mostrou ser uma potencial ferramenta contra o estresse hídrico em arroz vermelho;

O arroz vermelho apresenta ajustes bioquímicos em função da restrição hídrica do ambiente em que se desenvolve. No entanto, sob condições de inoculação com *G. diazotrophicus* as condições de deficiência hídrica são mitigadas;

O déficit hídrico no arroz vermelho inoculado com *G. diazotrophicus* aumenta a concentração dos osmoreguladores ativando a proteção contra danos celulares;

REFERÊNCIAS

- BARRETO, H. B. F. Variedade espacial de atributos do solo que influenciam a produção de arroz vermelho no Vale do Apodi - RN. 60 f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Federal Rural - Ufersa, Mossoró-RN, 2012.
- BARRETO, H. B. F. **Variabilidade espacial de atributos do solo que influenciam a produção de arroz vermelho no vale do apodi-RN**. Mossoró, RN, 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Federal Rural do Semi-árido.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (Ed.) Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal: Funep, 2012. 590 p.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995.
- DUTTA, D.; GACH12HUI, R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov. isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 353-357, 2007. PMID:17267978.
<http://dx.doi.org/10.1099/ ijs.0.64638-0>.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; SILVA JÚNIOR, E. B.; SILVA JÚNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R. Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, p. 2945-2951, 2012.
- FONSECA, J. R.; PEREIRA, J. A.; SILVA, S. C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C. Resgate de arroz vermelho (*oryza sativa* L.) nos estados da Paraíba e Ceará. Disponível em: www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/serie_documentos/doc_196/trabalhos/CBC-TRAB 5-2.pdf. Acesso em: 01 set. 2013.
- HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo (Documentos 325). Londrina: Embrapa Soja, 2011.
- LADHA, J.K.; TIROL-PADRE, A.; PUNZALAN, G.C.; WATANABE, I. Nitrogenfixing (C_2H_2 -reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v.33, p.187-200, 1987.
- MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.
- MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; SIMOES-ARAUJO, J. L.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, p.1448–1458, 2011.
- MENEZES, B. R. S.; MOREIRA, L. B.; PEREIRA, M. B.; LOPES, H. M.; COSTA, E. M.; CURTI, A. T. M. Características morfoagronômicas de dois genótipos de arroz vermelho em

cultivo inundado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v.7, n.3, p. 394-401, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª ed., Lavras: Editora UFLA, 2006, p.449-542.

KERSTERS, K.; LISDIYANTI, P.; KOMAGATA, K.; SWINGS, J. The Family Acetobacteraceae: The genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Eds.). *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Proteobacteria: Alpha and beta sub classes*. New York: Springer, 2006. v. 5, p.163-200.

PEDROSO, B. A. Arroz irrigado no projeto Rio Formoso-Goiás. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v.38, n.361, p.8-14, 1985.

PENTEADO, S.R. Introdução à agricultura orgânica – Normas e técnicas de cultivo. Campinas, SP. Editora Grafimagem, 2009. 110p..

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, p. 219-226, 2009.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A. VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.12, n.1, p.16-22, 1986.

SABINO, D. C. C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. Seropédica, 2007. 71p. Tese (Doutorado em Ciência do solo) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SIGMAPLOT. For windows, version 11.0. **Systat Software**, 2008.

SOUSA JÚNIOR, I. F. **A influência da urbanização no clima da cidade de Campina Grande-PB**. Campina Grande, PB, 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Meteorologia)- Curso de Pós-Graduação em Meteorologia, Universidade Federal de Campina Grande/UFCG.

SPENCER, J.; RAGOUT, A. **Métodos microbiológicos**. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA, 2001.

VELOSO, C. A. C.; BOTELHO, S. M.; LOPES, A. M.; CARVALHO, E. J. M. **Nutriçãomineral e adubação da cultura do arroz de sequeiro**. Belém-PA,: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 29 p. (Documentos, 360).

WAKELIN, S. A.; GREGG, A. L.; SIMPSON, R. J.; LI, G. D.; RILEY, I. T.; MCKAY A.C. Pasture management directly affects soil microbial community structure and Ncycling

bacteria. **Pedobiologia**, Austrália, v.52, n. 4, p.237–251, 2009.

ZILLI, J. E.; SILVA NETO, M. L.; FRANÇA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; MELO, A. R.

Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 35, p. 739-742, 2011.