

**POTENCIALIZAÇÃO DA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL
DE ARROZ VERMELHO INOCULADO COM *Gluconacetobacter*
*diazotrophicus***

ANTONIO MANOEL DA SILVA FILHO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPINA GRANDE, PB.**

FEVEREIRO DE 2016

**POTENCIALIZAÇÃO DA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL
DE ARROZ VERMELHO INOCULADO COM *Gluconacetobacter*
*diazotrophicus***

ANTONIO MANOEL DA SILVA FILHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre (M.Sc.) em Ciências Agrárias / Área de concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses

Coorientador: Prof. Dr. Alberto Soares de Melo

CAMPINA GRANDE, PB.

FEVEREIRO DE 2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586p Silva Filho, Antonio Manoel da
Potencialização da germinação e crescimento inicial de Arroz Vermelho Inoculado com *Gluconacetobacter Diazotrophicus* [manuscrito] / Antonio Manoel da Silva Filho. - 2016.
70 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2016.

"Orientação: Prof. Drº. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

1. *Oryza sativa* L. 2. Bactéria endofítica promotora de crescimento vegetal. 3. Fosfatase ácida. 4. -amilase. 5. Fator de transcrição GAMYB. I. Título. 21. ed. CDD 631.4

**POTENCIALIZAÇÃO DA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL
DE ARROZ VERMELHO INOCULADO COM *Gluconacetobacter
diazotrophicus***

ANTONIO MANOEL DA SILVA FILHO

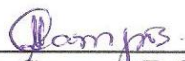
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre (M.Sc.) em Ciências Agrárias / Área de concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal.

Aprovada em 18 de Fevereiro de 2016

Banca Examinadora



Prof. Élide Barbosa Corrêa (D.Sc., Proteção de Plantas) - UEPB



Prof. Magnólia de Araújo Campos (D.Sc., Biologia Molecular) - UFCG/UITÉ



Prof. Alberto Soares de Melo (D.Sc., Recursos Naturais) - UEPB
Coorientador



Prof. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses (D.Sc., Biotecnologia Vegetal) - UEPB
Orientador

*Este trabalho reflete a soma de esforços mútuos, dedicação e compromisso
para o cumprimento de objetivos e metas estabelecidas ao longo
dessa jornada que tomei como sendo um ideal de vida....*

A família Nunes

A minha Avó “Moçinha” (In memoriam)

A meus Pais Antonio Manoel e Luzia Nunes

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Pai Celestial** e amigo, que chamo de **Deus**, o Grande El-Shadai, que em sua infinita graça e misericórdia me elegeu em Cristo Jesus antes da fundação do mundo.

À minha amada família. Minha esposa **Emanuela Soares da Silva** e à minha filha **Karen Emanuela Soares da Silva**, por tanto amor e compreensão, mesmo quando eu não tinha tempo para elas, e pela ajuda na condução dos experimentos, do início ao fim.

Aos meus pais, **Antonio Manoel da Silva** e **Luzia Nunes da Silva** que mesmo sem grau de estudo me incentivaram a buscar a vitória através do conhecimento, acreditando que eu seria vencedor. Aos meus irmãos, **Gerlândio Nunes, Gerleandro Nunes, Gilberlândio Nunes, Gilvanildo Nunes, Gilvâneide Nunes, Giliarde Nunes, Gildevânio Nunes, Gilderlândia Nunes, Gerleandro Nunes, Gercilene Nunes**, às gêmeas **Luziene Nunes e Luciene Nunes** por estarem sempre me incentivando a acreditar no amanhã e especialmente a **Gelcilândio Nunes** pela alegria e energia fornecida.

Aos meus avós **Alzira Tertulina, Francisco Cirilo Nunes (*In memorian*), Manoel Josino Ricarte e Maria Ana Nunes (*In memorian*)**, pelo amor incondicional demonstrado durante essa árdua caminhada.

Aos meus amigos **José Bruno Malaquias e Rener Luciano de Souza Ferraz**, pelo empenho e prazer em me ensinar quando não tinha tempo disponível e, pelas confecções de trabalhos científicos e apoio sempre nesta jornada acadêmica.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses**, pela confiança depositada e oportunidades dadas durante o período em que estive sob sua orientação.

Ao meu Coorientador **Prof. Dr. Alberto Soares de Melo**, pela forma amigável e respeitosa com a qual conduziu a missão de coorientar-me.

À **Maria do Socorro Rocha**, pela amizade e auxílio na execução de meu projeto de pesquisa.

À técnica do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, **Airla Laana de Medeiros Cavalcante**, pelo acolhimento, prestatividade e ajuda na condução desta pesquisa.

Aos demais colegas de Curso **Anselmo Ferreira da Silva, Carisa Rocha da Silva, Dalila Ribeiro Rodrigues, Daniela Duarte Barbosa, Emannuela Hayanna Alves de Lira, Emanuela Maria da Silva, Eveline de Sousa Araújo, José Celso Braga Fernandes, Maria Idaline Pessoa Cavalcanti, Ramon Freire da Silva, Rayssa Ribeiro da Costa, Renata Priscila Almeida Silva, Ruana Chagas da Silva, Saint-Clear Sena e Santos, Silvia Ramos de Oliveira, Thiele da Silva Carvalho, Ubieli Alves de Araújo Vasconcelos, Walmir Souza Vasconcelos**, pelos bons momentos que compartilhamos durante essa jornada.

Aos membros da banca examinadora, **Dr^a. Élide Barbosa Corrêa e Dr^a. Magnólia de Araújo Campos**, pelas contribuições ao trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – PPGCA** da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, pela oportunidade de realizar atividades inerentes à função de aluno de mestrado.

Ao **Corpo Docente** do PPGCA em especial os professores **Alberto Soares de Melo, Carlos Henrique S. Gadêlha Meneses, Élide Barbosa Corrêa, José Germano Veras Neto, Liziane Maria de Lima, Paulo Ivan Fernandes Júnior, Pedro Dantas Fernandes**, que tive o privilégio de cumprir carga horária inerente a suas componentes curriculares durante a carreira acadêmica.

À **Universidade Estadual da Paraíba**, pelo apoio logístico e técnico, que foi muito importante para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Embrapa Algodão** pela disponibilidade de suas instalações para execução do trabalho de dissertação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão de bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. Arroz vermelho	20
3.2. Germinação de sementes	22
3.3. Giberelinas	22
3.4. Ação das giberelinas sobre a germinação de cereais	24
3.5. Ação de bactérias promotoras de crescimento em plantas sobre a germinação	25
3.6. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Caracterização da área experimental	28

4.2.	Pré-teste de germinação das sementes	28
4.3.	Tratamentos das sementes.....	29
4.4.	Tratamentos em estudo	29
4.5.	Processo de inoculação das sementes	29
4.6.	Semeadura e teste de germinação	30
4.7.	Variáveis analisadas.....	31
4.7.1	Fisiológicas e de crescimento	31
4.7.2	Bioquímicas	32
4.7.3	Moleculares	33
4.8.	Análises estatísticas	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1.	Contagem do número de células viáveis do inoculante e nas sementes	36
5.2.	Variáveis fisiológicas e de crescimento.....	37
5.3.	Variáveis bioquímicas	46
5.4.	Correlação de Pearson entre as variáveis bioquímicas, fisiológicas e de crescimento 50	
5.5.	Variáveis moleculares.....	52
6.	CONCLUSÕES	56
7.	REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise por qPCR, específicos para cada gene, expressos em plântulas (parte aérea mais radículas) de arroz vermelho inoculado com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> . Campina Grande, PB, 2016.	34
Tabela 2. Contagem realizada no inoculante produzido e nas sementes inoculadas com a estirpe <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5, utilizada no experimento. Campina Grande-PB, 2016.	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química das giberelinas GA₁, GA₃, GA₄, GA₇. Fonte: Lavagnini *et al.*, 2014, Campina Grande, PB, 2016.....23
- Figura 2.** Inoculação de *G. diazotrophicus* em Erlenmeyers contendo meio DYGS, sob agitação de 150 rpm por 48 horas em agitador orbital (A) e inoculação de sementes de arroz vermelho com *G. diazotrophicus* em placas de Petri (B), Campina Grande, PB, 2016..... 30
- Figura 3.** Papel germtest sendo umedecido com água destilada autoclavada (A), acondicionamento de sementes de arroz vermelho em caixa gerbox de forma equidistante (B) e mantidas em B.O.D a 27 °C com 12 horas de fotoperíodo (C), Campina Grande, PB, 2016.....31
- Figura 4.** Germinação (A) e índice de velocidade de germinação (B) de sementes de arroz vermelho mediante inoculação com *G. diazotrophicus*. Campina Grande, PB, 2016.37
- Figura 5.** Primeira contagem de germinação de sementes de arroz vermelho aos cinco dias após a semeadura, inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* nas sementes. Campina Grande, PB, 2016.....40
- Figura 6.** Comprimento radicular (A) e comprimento da parte aérea (B) de plântulas de arroz vermelho mediante a inoculação de *G. diazotrophicus* nas sementes. Campina Grande, PB, 2016.42
- Figura 7.** Massa fresca total (A) e massa seca total (B) de plântulas de arroz vermelho com sementes não embebidas em água, embebidas em água e em solução de ácido giberélico e inoculadas com *G. diazotrophicus*, aos 14 dias após semeadura. Campina Grande, PB, 2016.44

Figura 8. Plântulas de arroz vermelho, não embebidas e não inoculadas (SNE) (A) e não embebidas e inoculadas com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (SNE + GD) (B), aos 14 dias após sementeira. Campina Grande, PB, 2016.	45
Figura 9. Atividade da α -amilase (A) e atividade da fosfatase ácida de plântulas de arroz vermelho mediante a não embebição e embebição em água, em solução de ácido giberélico e inoculação de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> nas sementes. Campina Grande, PB, 2016. ...	48
Figura 10. Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis: fosfatase ácida (FOA), α -amilase (APA), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento radicular (CRD), % germinação (GER), índice de velocidade de germinação (IVG), massa seca total (MST), massa fresca total (MFT) e primeira contagem de germinação (PCG) de plântulas de arroz vermelho com sementes não embebidas em água, embebidas em água e em solução de ácido giberélico e inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> , aos 14 dias após sementeira. Campina Grande, PB, 2016.	51
Figura 11. Expressão relativa de fator de transcrição GA-MYB (Os01g0812000), α -amilase (Os02g0765600), S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase (Os01g0323600) de plântulas de arroz vermelho mediante a não embebição e embebição em água, em solução de ácido giberélico e inoculação de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> nas sementes. Campina Grande, PB, 2016..	54

LISTA DE SIGLAS

°C—Graus Celsius	mM—Milimolar
µg—Microgramas	mRNA— RNA mensageiro
µL— Microlitros	nm—Nanômetros
ANVISA—Agência Nacional de Vigilância Sanitária	nmoles—Nanomoles
B.O.D—Demanda biológica de oxigênio	PB— Paraíba
BPCP—Bactérias promotoras do crescimento de plantas	pb— Pares de bases
cDNA—DNA complementar	pH—Potencialhidrogeniônico
cm—Centímetro	PVC—Policloreto de vinila
DNA— Ácido desoxirribonucleico	qPCR— Reação em cadeia polimerase em tempo real
G—Giros	RNA= Ácido ribonucleico
g—Gramas	SAM— S-adenosil-L-metionina
GA/GAs— Giberelina/giberelinas	SE— sementes embebidas em água e/ou ácido giberélico
GA ₃ — Ácido giberélico	SNE— Sementes não embebidas em água
GD— <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	tRNA—RNA transportador
kg—Quilogramas	UBQ5—Ubiquitina
Log—Logaritmo	USDA— Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
mg— Miligramas	
min—Minutos	

RESUMO

SILVA FILHO, A.M. Potencialização da germinação e crescimento inicial de arroz vermelho inoculado com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Campina Grande, PB, 2016. 70p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Área de concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal. Universidade Estadual da Paraíba – UEPB. antonio.uepb@gmail.com

A utilização de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na agricultura tem-se mostrado promissora na otimização de aspectos morfofisiológicos, bioquímicos e rendimento das plantas. A cultura do arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) apresenta grande importância socioeconômica e ambiental no semiárido nordestino. A produção dessa cultura ainda padece pela não utilização plena de tecnologias apropriadas, devido a escassez de estudos e desenvolvimento de tecnologias. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito potencial da *G. diazotrophicus* sobre a germinação e crescimento inicial de arroz vermelho. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, constando de seis tratamentos (SNE-sementes não embebidas em água, SE H₂O-sementes embebidas em água por 24h, SE H₂O + GA₃-sementes embebidas em solução de ácido giberélico por 24h, SE H₂O + GD-sementes embebidas em água por 24h + *G. diazotrophicus*, SE H₂O + GA₃ + GD-sementes embebidas em solução de ácido giberélico por 24h + *G. diazotrophicus* SE SNE + GD-sementes não embebidas em água + *G. diazotrophicus*), com seis repetições. A concentração da solução de ácido giberélico (GA₃) usada foi de 50 mg L⁻¹. Avaliaram-se os aspectos fisiológicos, bioquímicos, moleculares e de crescimento inicial das plântulas de arroz vermelho. Os dados foram submetidos à análise de

variância, teste de médias e correlação de Pearson. Os tratamentos exerceram efeito significativo sobre as variáveis de crescimento, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Registrou-se que o tratamento com sementes não embebidas e inoculadas com *G. diazotrophicus* promoveram incrementos de 28,7; 41,7; 28,7; 49,5; 69,6; 48,5; 61,5; 38,5; 46; 97; 86 e 89% para as variáveis: germinação, índice de velocidade de germinação, primeira contagem de germinação, comprimento radicular, comprimento da parte aérea, massa fresca total, massa seca total, atividade da α -amilase, atividade da fosfatase ácida, expressão do fator de transcrição GAMYB, α -amilase e S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase, respectivamente, em relação ao tratamento das sementes não embebidas em água e não inoculadas. Concluiu-se que a inoculação de *G. diazotrophicus* em sementes de arroz vermelho aumenta a velocidade de germinação e germinação das plântulas, comprimento radicular, comprimento da parte aérea, atividades da fosfatase ácida e α -amilase, massa fresca total, massa seca total, a expressão do fator de transcrição GAMYB, expressão de α -amilase e SAM. Portanto apresenta grande potencial agrônomico e biotecnológico para aplicação como promotora de crescimento na cultura do arroz vermelho, incrementando a germinação e crescimento inicial de modo independente de embebição das sementes.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L.; Bactéria endofítica promotora de crescimento vegetal; fosfatase ácida; α -amilase; fator de transcrição GAMYB.

ABSTRACT

SILVA FILHO, A.M. Priming of the germination and initial growth of red rice inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Campina Grande, Paraíba State, Brazil, 2016.70p. Dissertation (Graduate Program in Agricultural Sciences,). Concentration Area: Biotechnology and Plant Improvement. State University of Paraíba- UEPB– antonio.uepb@gmail.com

The utilization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in agriculture has shown promise in optimization morphophysiological aspects, biochemical and yield of plants. The culture of red rice (*Oryza sativa* L.) presents great socioeconomic and environmental importance in the semi-arid northeast. The production of this culture still suffers by the not full use of appropriate technologies, due to scarcity of studies and development of technologies. Given the above, the objective of this study was to evaluate the potential effect of *G. diazotrophicus* on germination and initial growth of red rice. The experiment was conducted in a completely randomized design, with six treatments (SNE-seeds not soaked in water, SE H₂O-seeds soaked in water for 24 hours, SE H₂O + GA₃ seed soaked in gibberellic acid solution for 24 hours, SE H₂O + GD-seeds soaked in water for 24 + *G. diazotrophicus*, SE H₂O + GA₃ + GD-seeds soaked in gibberellic acid solution for 24 hours + *G. diazotrophicus* and SNE + GD-seeds not soaked in water + *G. diazotrophicus*) with six replicates. The concentration of gibberellic acid (GA₃) used was 50 mg L⁻¹. Evaluated were the aspects physiological, biochemical, molecular and initial growth of red rice seedlings. Data were submitted to analysis of variance, mean test and Pearson correlation. Treatments significant effect on the growth variables, physiological, biochemical and

molecular. It was verified that treatment with non-imbibed seeds inoculated with *G. diazotrophicus* promote increase of 28.7; 41.7; 28.7; 49.5; 69.6; 48.5; 61.5; 38.5; 46; 97; 86 and 89% for the variables: germination, germination speed index, first count, root length, shoot length, total fresh mass, total dry mass of α -amylase activity, activ acid phosphatase, expression GAMYB transcription factor, α -amylase and S-adenosyl-L-methionine (SAM) synthase, respectively, in relation to the treatment of seeds not soaked in water and not inoculated. It was concluded that the inoculation with *G. diazotrophicus* red rice seeds enhances the speed of germination and seedling germination, root length, shoot length, and acid phosphatase activities of α -amylase, total fresh mass, total dry mass, GAMYB expression of the transcription factor, α -amylase expression and SAM. Therefore presents great potential agronomic and biotechnology for use as growth promoter in the red rice crop, increasing the germination and early growth independently of seed imbibition.

Key-words: *Oryza sativa* L.; Endophytic bacteria promoting plant growth; acid phosphatase; α -amylase; GAMYB transcription factor.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais exploradas no Brasil. O Brasil está situado entre os dez maiores produtores mundiais, destacando-se como o maior produtor da América Latina (FERREIRA *et al.*, 2014). Ressalte-se que o cultivo de arroz destaca-se no cenário nacional como cultura de expressiva importância para o setor agrícola brasileiro. Acrescente-se que o cultivo de arroz vermelho é uma das principais atividades econômicas para o agronegócio da região semiárida do Nordeste Brasileiro.

Na safra 2015/2016, a área cultivada com arroz tradicional foi de 2.207,0 mil hectares, tendo a região Nordeste contribuído com 21% da área total e em 6,27% na produção nacional. No Estado da Paraíba foram cultivados 0,9 mil hectares com esta cultura, com produção de 0,7 mil toneladas (CONAB, 2015). Contudo, a produção de arroz vermelho concentra-se na Paraíba, sendo plantado cerca de cinco mil hectares por ano, quase metade da área total plantada no Brasil (GOVERNO DA PARAÍBA, 2015).

O potencial social, ambiental e econômico do arroz vermelho cultivado na Paraíba é indiscutível. Porém, a cadeia produtiva necessita do emprego de tecnologias para ampliar a produção de arroz vermelho. Uma alternativa viável para incremento de produção da cultura é a modernização dos sistemas de produção, através de sistemas de irrigação, haja vista que a atual produção é de sequeiro (GOVERNO DA PARAÍBA, 2015).

Outra prática potencial para otimização da cadeia produtiva do arroz vermelho é a utilização do ácido giberélico (GA_3), notadamente, em virtude desse hormônio ter sido associado a diversos efeitos, dentre os quais destacam-se o aumento no percentual de germinação de sementes e no índice de velocidade de germinação, no crescimento e desenvolvimento das plantas (DOURADO

NETO *et al.*, 2014; CATO, 2006; GROHS *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2015). Ressalte-se ainda o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas, que exercem efeitos positivos sobre a percentagem de germinação de sementes, comprimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, aumento do número de flores e rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma potencial bactéria promotora de crescimento vegetal, Gram-negativa, pelo estabelecimento de relações endofíticas com as plantas (MENESES, 2010). O uso desta bactéria no processo germinativo de arroz vermelho é de grande valia, haja vista seu efeito significativo sobre o índice de velocidade de brotação em cana-de-açúcar, resultando em maior massa de matéria seca das gemas, massa seca das raízes, parte aérea e massa seca total de cana-de-açúcar (GIRIO *et al.*, 2015) maior produção de massa seca e no tamanho das plantas de arroz vermelhas fase vegetativas (DUTRA *et al.*, 2014).

Pesquisas envolvendo a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plantas são importantes para subsidiar o desenvolvimento científico e tecnológico, notadamente, objetivando aumentar a eficiência do cultivo, incrementando a produção de arroz vermelho do Estado da Paraíba. Segundo Harper (1997), durante o ciclo de vida de uma planta, as fases iniciais do desenvolvimento são consideradas cruciais, visto que, entre a germinação da semente e o estabelecimento da plântula, ocorrem as maiores taxas de mortalidade. De acordo com Floss (2004), a análise quantitativa do crescimento é o primeiro passo na análise de produção vegetal e requer informações que podem ser obtidas sem necessidade de equipamentos sofisticados, sendo estas informações obtidas de forma direta de acordo com a dinâmica de produção de biomassa vegetal.

A mensuração de variáveis inerentes à germinação de sementes de arroz vermelho inoculado com *G. diazotrophicus* pode contribuir significativamente na cadeia produtiva desta cultura, proporcionando aos produtores e à comunidade científica maior segurança no momento de fazer a semeadura em campo.

A quantificação de componentes bioquímicos e moleculares, tais como atividade da fosfatase ácida e α -amilase, expressão relativa de α -amilase, fator de transcrição GAMYB e S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase, constitui uma alternativa importante para o monitoramento inicial do estado nutricional das plantas, caracterizando uma ferramenta de diagnóstico para os benefícios ou problemas metabólicos relacionados ao uso de ácido giberélico e *G. diazotrophicus*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito potencial da *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre a germinação e o crescimento inicial de arroz vermelho sob condições controladas.

2.2. Objetivos específicos

Analisar o crescimento de plântulas de arroz vermelho inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, em ambiente protegido;

Avaliar a germinação de arroz vermelho após a inoculação com *G. diazotrophicus*, sob condições controladas;

Avaliar os efeitos dos tratamentos de inoculação com *G. diazotrophicus* no arroz vermelho em contraste com a aplicação de ácido giberélico, na fisiologia e crescimento inicial, bioquímica e a nível molecular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Arroz vermelho

O arroz é um importante cereal, presente em grande parte do mundo, principalmente nos países asiáticos e países em desenvolvimento, desempenhando um papel estratégico a nível econômico e social (GUIMARÃES e BALDANI, 2013). É um dos alimentos mais consumidos mundialmente, sendo o Brasil um dos dez maiores produtores do cereal (SANTOS *et al.*, 2014).

No Brasil, o arroz vem se destacando, com incremento na produção, onde em 2014 foram plantadas 2.295,1 milhões de hectares, com produção de 12.436,1 milhões de toneladas, sendo que em 2015 plantou-se 2.207,0 milhões de hectares, resultando numa produção de 11.921,3 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Ainda segundo a Conab (2015), o arroz ocupa a terceira maior produção de grãos do país, ficando atrás da produção de milho com produção de 84,6 milhões de toneladas e da soja com 96,2 milhões de toneladas.

Acredita-se que o centro de origem do arroz seja o sudeste asiático para a China, surgindo por volta de 3.000 a.C., de onde foi levado para a Coreia e posteriormente, para o Japão, e no Brasil foi introduzido quando as caravelas de Pedro Álvares Cabral apontaram na Bahia, no século XVI (CASTRO *et al.*, 2005).

O arroz vermelho ou arroz da terra, como é mais conhecido, possui sementes com pericarpo avermelhado, aristas longas, altas taxas de dormência e debilidade natural (FONSECA *et al.*, 2006). O pigmento vermelho do grão do arroz é uma proantocianina de grande valor para a alimentação humana, pois melhora a digestibilidade e tem ação antioxidante benéfica para o sistema cardiovascular, além de ser repelente contra patógenos (PEREIRA *et al.*, 2008).

Apesar de ser considerada uma planta daninha, o arroz vermelho é um dos principais componentes na dieta alimentar das populações que habitam grande parte do semiárido nordestino brasileiro, principalmente, como lavoura de subsistência (MENEZES *et al.*, 2011). Em 2010, o Estado do Paraíba destacava-se como o maior produtor de arroz vermelho, seguido de perto pelo Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará, Bahia e Minas Gerais (MENDES, 2010). É no sertão do estado da Paraíba que se concentra a maior produção de arroz vermelho do Brasil e este é plantado principalmente agricultores familiares, utilizando sistemas de produção bastante rudimentares (WEBER, 2012). Atualmente, são ao todo, cinco mil hectares de arroz vermelho (metade da área plantada no Brasil), distribuídos entre Itaporanga, Pedra Branca, Nova Olinda, Curral Velho, Santana dos Garrotes (cidades pertencentes ao Vale do Piancó), plantadas nas várzeas dos rios que são mais úmidas e férteis, desta forma, desde 2010 vem mantendo o *ranking* de maior produtor de arroz vermelho do país (GOVERNO DA PARAÍBA, 2015). O arroz vermelho, ultimamente vem conquistando uma demanda crescente por parte de restaurantes localizados em grandes centros consumidores do país, como São Paulo, Rio de Janeiro e Brasília, sendo considerada uma iguaria gastronômica, pois segundo Weber (2012), a coloração vermelha, os teores de ferro e zinco, prevenção de doenças cardiovasculares, obesidade e câncer, são os principais atrativos para os consumidores do arroz vermelho. Esse tipo de arroz vem tendo maior demanda pelo mercado consumidor, que oferece maiores preços, favorecendo a remuneração e a sustentabilidade do sistema de agricultura familiar (BRITO *et al.*, 2014).

Segundo Gusmão *et al.* (2008), a preservação e o aproveitamento da variabilidade genética do arroz vermelho é de suma importância, assim devem ser estabelecidas prioridades imediatas, haja vista que o abandono desse material pode representar a ameaça iminente de desaparecimento de um inestimável material genético, os quais serão de grande importância para a segurança alimentar de grande parte das famílias nordestinas e também para o seu melhoramento genético.

3.2. Germinação de sementes

A germinação de sementes é um fator determinante no estabelecimento de culturas, tanto no campo, como na produção de mudas em casa de vegetação, dentre outros fatores. Esta germinação corresponde à transformação do embrião da semente numa nova planta, à custa de reservas alimentares, correspondendo a uma sequência de eventos que dependem de fatores da própria semente (internos) e fatores externos ou ambientais (NASSIF *et al.*, 1998).

Dentre os principais fatores externos que influenciam a germinação podemos citar a luz, a temperatura, a luminosidade, disponibilidade de água e o oxigênio (REIS *et al.*, 2014; GUIMARAES *et al.*, 2010; WAGNER JUNIOR *et al.*, 2005). De acordo com Leite (2000), a luz é um fator que atua sobre os hormônios de crescimento das plantas, influenciando dessa forma a germinação. A sensibilidade das sementes varia de acordo com as espécies, onde a ação da luz sobre o processo de germinação recebe o nome de fotoblastismo positivo, negativo ou neutro, dependendo da luz para germinar, germinação na ausência de luz e as que são indiferentes à luz, no que se refere à germinação, respectivamente (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Por outro lado, a temperatura é um fator que influencia as reações bioquímicas que regulam o metabolismo necessário para iniciar o crescimento do embrião e, em consequência, a porcentagem e a velocidade de germinação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Já a disponibilidade de água para a embebição das sementes é um fator determinante (GUIMARAES *et al.* 2010), onde a umidade do substrato é fundamental para desencadear o processo de germinação, pois a hidratação dos tecidos da semente amolece o tegumento e reativa o metabolismo do embrião e tecido de reserva, permitindo a difusão dos reguladores de crescimento e, conseqüentemente, a ativação dos sistemas enzimáticos.

Após essa sequência de fatos, ocorrem a degradação, a translocação e a assimilação das reservas, resultando no crescimento do embrião (MARCOS FILHO, 2005).

3.3. Giberelinas

A Giberelina ou ácido giberélico (GA_3) é um hormônio vegetal, largamente distribuído no reino vegetal, sendo sintetizadas principalmente no ápice caulinar e nas folhas jovens, estando presentes nas sementes, embriões, caules, folhas e grãos de pólen, ou seja, em toda a planta (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Esse fitormônio foi descoberto em 1926 pelo cientista japonês E. Kurosawa que estudava uma doença do arroz (*Oryza sativa*) denominada de doenças das “plantinhas loucas” onde as plantas de arroz cresciam rapidamente, mas sem produzir semente (LAVAGNINI *et al.*, 2014).

Segundo esses autores, as plantas doentes eram mais altas do que as saudáveis, com coloração amareladas e presença de murchas, apresentando tendência a cair.

Os estudos e esforços se intensificaram, os resultados vieram e ficou comprovado que se tratava de uma doença causada pelo fungo *Gibberellafujikuroi*, produtor de uma “toxina” que era responsável pelos sintomas da doença (MATSUMOTO, 2005).

Kurosawa isolou esta toxina e posteriormente deu a essa substância o nome de giberelina. Nas últimas décadas, os cientistas isolaram e descobriram que os fungos *Sphacelomamanihoticolae Neurospora crassa*, representavam as principais fontes produtoras de GA₃ e GA₄ além dos fungos Ascomycetos e das plantas superiores (MATSUMOTO, 2005). Atualmente são mais de 78 giberelinas que já foram isoladas e identificadas quimicamente. Segundo Lavagnini et al. (2014), de todas as giberelinas (GAs) descobertas, uma pequena fração possui atividade biológica e entre essas podemos citar a GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇ (Figura 1). Estes autores afirmam que a GA₁ é a bioativa mais comum nas plantas e o grupo mais bem estudado é o GA₃, também conhecido por ácido giberélico, sendo produzido pelo mesmo fungo, *Gibberellafujikuroi*. Todas as outras GAs são consideradas precursores ou intermediários na biossíntese, podendo ainda se constituir em compostos inativos. Observa-se na Figura 1 a estrutura química desses grupos de giberelinas.

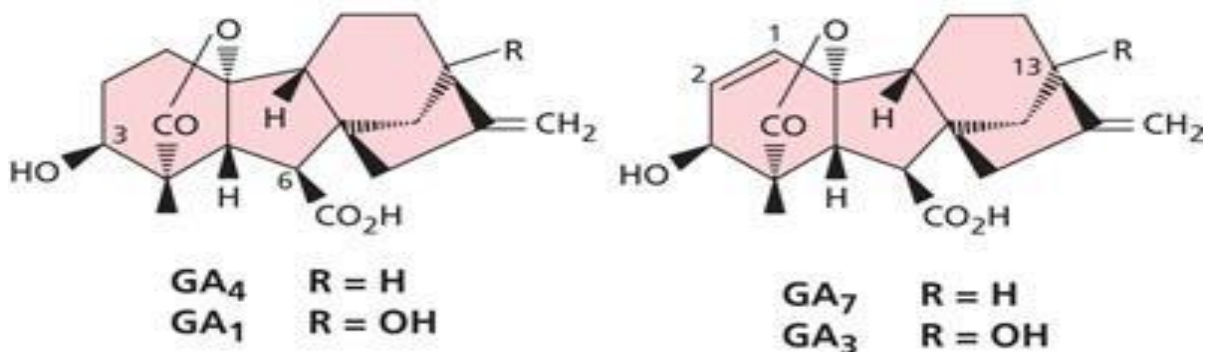


Figura 1. Estrutura química das giberelinas GA₁, GA₃, GA₄, GA₇. Fonte: Lavagnini *et al.*, 2014, Campina Grande, PB, 2016.

As giberelinas influenciam em várias características importantes das plantas como a formação de flores femininas, longevidade das flores, promoção da indução de gemas florais, diferenciação sexual, estimulação da partenocarpia, crescimento e maturação dos frutos (TAIZ e ZEIGER, 2009). Exerce também importante papel na germinação de sementes, uma vez que está envolvido na quebra de dormência e no controle da hidrólise de reservas, as quais são essenciais para o crescimento do embrião (LAVAGNINI *et al.*, 2014). Ressalte-se ainda que as giberelinas estimulam o alongamento celular, fazendo com que a radícula rompa o tegumento da semente.

O ácido giberélico ($C_{19}H_{22}O_6$) é também um regulador de crescimento vegetal, cuja classificação toxicológica se enquadra na Classe IV, tendo seu uso agrícola autorizado para aplicação em sementes de arroz, cevada, feijão, milho, soja e trigo, bem como durante o crescimento e desenvolvimento destas plantas (ANVISA, 2012).

3.4. Ação das giberelinas sobre a germinação de cereais

Os cereais mais produzidos e consumidos no mundo são o arroz (*Oryza sativa*L.), o trigo (*Triticumaestivum*L.) e o milho (*Zeamays*L.) (USDA, 2009).

Na literatura, constata-se diversos resultados positivos para o uso de bioestimulantes a base de giberelinas nas principais culturas de interesse comercial. Chiarelo (2007) constatou correlação positiva dos tratamentos com aplicação de biorreguladores na semente de arroz, nos quais houve maior índice de velocidade de emergência (IVE) nos tratamentos com a utilização da maior dose do Stimulate. Já Rodrigues et al. (2015) constataram que o aumento das doses de biorreguladores aplicadas nas sementes influenciaram positivamente no crescimento da parte aérea das plântulas de arroz. De acordo com Grohset al. (2012) a aplicação do ácido giberélico é eficiente em estimular a germinação de diferentes cultivares de arroz, resultando em maior estatura das plantas da cultivar Irga 425. Estes autores também observaram efeito positivo do ácido giberélico na quantidade de colmos por planta e na produção de matéria seca.

Na cultura do milho, a aplicação de bioestimulante nas sementes resultou em efeitos positivos para a maioria das características fisiológicas da planta, aumentando a massa seca das raízes, a altura das plantas, área foliar, altura das plantas e massa seca do caule (SANTOS *et al.*, 2013). Dourado Neto et al. (2014) avaliando o diâmetro do colmo, observaram que os tratamentos que receberam o bioestimulante, nas diferentes doses e formas de aplicação, não se diferenciaram entre si, porém proporcionaram aumento significativo em relação à testemunha. Já o número de grãos por fileira apresentou diferenças significativas, as maiores médias foram obtidas pelos tratamentos com aplicação via semente, em todas as doses, sendo que na dose de 150 mL, obtiveram os melhores resultados para essa variável. Ainda segundo estes autores, independentemente da concentração e da forma de aplicação do bioestimulante a base de giberelinas, essas apresentaram desempenho superior em relação à testemunha, para todas as variáveis analisadas.

Em trigo, Cato (2006) estudando o efeito de reguladores de crescimento composto por ácido giberélico, ácido indolbutírico e cinetina aplicados via semente, constatou aumentos significativos na altura da planta, massa seca da parte aérea, número de perfilhos e de espigas por planta de trigo, no radicular vertical e total, bem como na velocidade do crescimento radicular

vertical. Entretanto, o autor não verificou efeito significativo para a porcentagem de plântulas normais, vigor de plântulas, produção de grãos por planta e produtividade. Já a aplicação de reguladores vegetais a base de giberelina e outros compostos (IBA+GA+KT), não interferiram na emissão de perfilhos e no acúmulo de matéria seca em plantas de trigo até o final do perfilhamento (FIOREZE e RODRIGUES, 2014).

Segundo Georginet al. (2014), os hormônios vegetais (citocinina, giberelina e auxina) não promovem diferença significativa para as variáveis relacionadas à germinação das sementes de trigo, por outro lado, promovem diferenças gritantes no desenvolvimento inicial das plantas.

3.5. Ação de bactérias promotoras de crescimento em plantas sobre a germinação

Academicamente, as bactérias promotoras de crescimento são conhecidas como “plantgrowth-promotingbacteria” (PGPB) ou “bactérias promotoras do crescimento de plantas” (BPCP), podendo colonizar diferentes órgãos das plantas e exercendo efeitos benéficos sobre as mesmas (AMORIM e MELO, 2002; DEY *et al.*, 2004). Os principais efeitos observados na promoção de crescimento de plantas são: aumentos da taxa de germinação de sementes, comprimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, aumento do número e flores e rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Matos et al. (2015), estudando o efeito positivo de *Bradyrhizobium e Rhizobium* sobre a germinação e crescimento radicular de cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação, constataram efeitos significativos positivos sobre a taxa de germinação dos mini-toletes inoculados. Além disso, científicaram também efeitos significativos sobre o volume total das raízes, o que levou os autores a concluírem que isolados de *Bradyrhizobium e Rhizobium* apresentam potencial como agentes promotores de crescimento da cana-de-açúcar através de mecanismos ainda não conhecidos.

Girioet al. (2015), avaliando uma mistura com cinco espécies de bactérias promotoras de crescimento em plantas (*G. diazotrophicus, Azospirillumamazonense, Burkholderia tropica, Herbaspirillumseropedicae e H. rubrisubalbicans*) em cana-de-açúcar, contataram que não houve efeito sobre as gemas brotadas, porém científicaram efeito significativo sobre índice de velocidade de brotação (IVB), resultando em maior massa de matéria seca das gemas, massa seca das raízes, parte aérea e massa seca total.

Szilagyi-Zecchinet al. (2015), estudando a germinação de sementes de tomateiro inoculadas com *Bacillusmyloliuefaciens* subsp. *plantarum*, verificaram que os tratamentos não

alteraram significativamente o percentual de germinação das sementes e da quantidade de plantas anormais, entretanto promoveu o aumento do volume da parte aérea das plântulas.

Segundo Schlindwein et al. (2008), isolados de *Bradyrhizobium* sp. produzem baixas quantidades de ácido indol-acético-AIA (1,2 a 3,3 µg mL⁻¹) e elevam alguns dos parâmetros de germinação e de crescimento das plântulas de alface em relação ao tratamento sem inoculação com rizóbios. De acordo com estes autores, é recomendável a inoculação de sementes de alface com rizóbios que produzem baixas quantidades de AIA, atua como promotora de crescimento e melhora os parâmetros de germinação das sementes.

Em sementes de milho, os resultados de germinação das sementes recobertas mostraram que a inoculação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* Z67 não afetaram a germinação das sementes, onde a mesma aumentou a massa de matéria fresca das raízes em 38%, em relação ao controle (CONCEIÇÃO et al., 2008).

De acordo com Soares et al. (2012), o tratamento de sementes de arroz com rizobactérias (*Pseudomonas synxantha* e *P. fluorescense* *Bacillus*) incrementa o potencial fisiológico de sementes de arroz com baixa qualidade, constatados efeitos positivos sobre a percentagem de germinação, primeira contagem da germinação e emergência aos 14 dias. Estes autores garantem a eficiência de *Pseudomonas synxantha* para o tratamento de sementes de arroz, por estimular a germinação e emergência.

O desempenho fisiológico de sementes de arroz de diferentes qualidades fisiológicas inoculadas com rizobactérias é influenciado positivamente, sendo tais efeitos significativos para germinação, primeira contagem da germinação, percentual e índice de velocidade de emergência, comprimento das partes aérea e radicular (SOARES et al., 2014).

3.6. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

A bactéria *G. diazotrophicus* pertencente ao filo das Proteobactérias, classe α -proteobacteria, família *Acetobacteraceae*, é uma bactéria Gram-negativa, não tem movimento espiralado, com pH ótimo de crescimento na faixa de 4,5-5,8 e com células variando entre (0,7 a 0,8 µm) x (2 a 4 µm), ela utiliza ácido 2-ceto glucônico como uma fonte de carbono, o que favorece a fixação de nitrogênio (MENESES, 2010). Esta bactéria cresce em alta concentração de sacarose (10% sacarose) e pH muito baixo (3,0) e tem a habilidade de fixar nitrogênio em condições microaerofílicas (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988). O pH ótimo para crescimento está ao redor de 5,5, embora os valores de pH e taxa de respiração possam variar consideravelmente de acordo com as fontes de carbono (STEPHAN et al., 1991).

G. diazotrophicus tem alta tolerância a tratamentos de calor e concentrações de sais no meio de cultura (TEJERA *et al.*, 2003). Dentre as propriedades fisiológicas características dessa espécie de bactéria destacam-se a tolerância a altas concentrações de sacarose; acidez e habilidade de excretar o nitrogênio fixado, conforme descrito por Cojhoet al. (1993).

Segundo Meneses (2011), a fixação de nitrogênio depende da capacidade do microrganismo estabelecer-se endofiticamente no interior da planta e, para que isso ocorra, o microrganismo deve ser capaz de invadir e proliferar nos tecidos da planta hospedeira, ultrapassando as barreiras físicas e químicas que a planta estabelece, instituindo vias de infecção e sítios de colonização, e o estabelecimento desta relação dependem de uma sequência de etapas e de uma relação específica entre planta e bactéria.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da área experimental

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Ecofisiologia de Plantas Cultivadas (ECOLAB) e no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM), nas dependências do Complexo Integrado de Pesquisa Três Marias, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB-CAMPUS I), em Campina Grande, PB. A pesquisa compreendeu a fase de germinação de sementes de arroz vermelho, sob efeito da aplicação de giberelina e inoculação com *G. diazotrophicus*.

4.2. Pré-teste de germinação das sementes

Com o intuito de avaliar a qualidade fisiológica das sementes de arroz vermelho, genótipo 405 Embrapa Meio Norte, realizou-se um pré-teste da germinação das sementes. Neste experimento, utilizou-se de 100 sementes não embebidas em água, sendo colocadas para germinar em duas caixas gerbox, de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.3 e 4.6, que se refere ao tratamento das sementes e da sementeira. É importante salientar que esse pré-teste não teve inoculação e aplicação de ácido giberélico, bem como não foram embebidas em água.

As sementes possuíam boa qualidade fisiológica para prosseguir com o experimento original, pois foi verificado aos 5 dias uma percentagem de germinação de 78 e 80%, aos 14 dias 80 e 84%, e um índice de velocidade de emergência de 116 e 127. Entretanto, observou-se que as plantas eram raquíticas e sem vigor, provavelmente devido a falta de embebição das sementes.

4.3.Tratamentos das sementes

Com o objetivo de evitar a contaminação das sementes por fungos epifíticos das próprias sementes, retiraram-se os tegumentos das sementes. Antes da embebição das sementes, as sementes foram desinfestadas com álcool a 70% (30segundos) e hipoclorito de sódio a 2% (30segundos), seguidos de lavagem com água destilada autoclavada durante 30 segundos, sendo a lavagem realizada duas vezes. Após este processo, as sementes foram colocadas para secar em fluxo laminar, sendo em seguida embebidas e inoculadas, conforme item 4.4 e 4.5, respectivamente.

4.4.Tratamentos em estudo

O experimento foi realizado para avaliar a germinação de sementes de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.), genótipo 405 Embrapa Meio Norte. O experimento foi arranjado em delineamento inteiramente casualizado, constando de seis tratamentos (T1= SNE –sementes não embebidas, T2= SE H₂O - sementes embebidas em H₂O por 24h, T3= SE H₂O + GA₃ - sementes embebidas em solução de GA₃ por 24h, T4= SE H₂O + GD - sementes embebidas em H₂O por 24h + *G. diazotrophicus*, T5= SE H₂O + GA₃ +GD - sementes embebidas em solução de GA₃ por 24h + *G. diazotrophicuse* T6= SNE + GD - sementes não embebidas + *G. diazotrophicus*), com seis repetições. Como veículo de inoculação da bactéria, utilizou-se turfa, ondenas testemunhas a turfa não continha a bactéria. A concentração da solução de ácido giberélico (GA₃) utilizada foi de 50 mg L⁻¹. A bactéria utilizada foi *G. diazotrophicuse* estirpe PAL5, com 48 horas de crescimento.

As sementes foram embebidas em água e em solução de ácido giberélico (GA₃) por um período de 24 horas, conforme descrito acima. Para tanto, utilizou-se de béqueres contendo água destilada autoclavada e a solução de ácido giberélico, e logo em seguida colocou-se as sementes tratadas conforme disposto no tópico 3.3. Os béqueres contendo os tratamentos com as sementes embebidas em água e ácido giberélico foram envolvidas em papel alumínio para proteger as sementes e a solução da luz, acondicionados em fluxo laminar, livre de contaminantes por 24 horas. Logo após seguiu-se o processo de inoculação das sementes, com os diferentes tratamentos, conforme item 4.5.

4.5.Processo de inoculação das sementes

Na inoculação, foi utilizada uma estirpe de *G. diazotrophicus* PAL5, cujas características são: capacidade de solubilizar fósforo *in vitro*, produção de AIA e redução de acetileno. A

estirpe foi reativada em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura 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, com pH 6,8 (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986), a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 48 horas. Em seguida, a bactéria 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 supracitadas. 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 25 mL do meio DYGS a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 48 horas (Figura 2 A).

O número de células viáveis foi determinado pelo método de microgota, no respectivo meio e nas sementes inoculadas (SPENCER e RAGOUT, 2001). Em seguida, 15 mL do caldo bacteriano foram adicionados em sacos de polipropileno estéril, contendo 35 g de turfa para produzir o inoculante. Em seguida, o inoculante foi homogeneizado e incubado a 30 °C por um período de 24 horas (fase de maturação). Perpassado esse período, as sementes de arroz foram misturadas com o inoculante (turfa) numa proporção de 250 g de inoculante para cada 20 kg de sementes de arroz (FERREIRA, 2004), (0,2 g de turfa, 6 g de sementes e 0,4 mL do meio), em placas de Petri (6 x 1,5 cm) e autoclavadas (Figura 2 B).

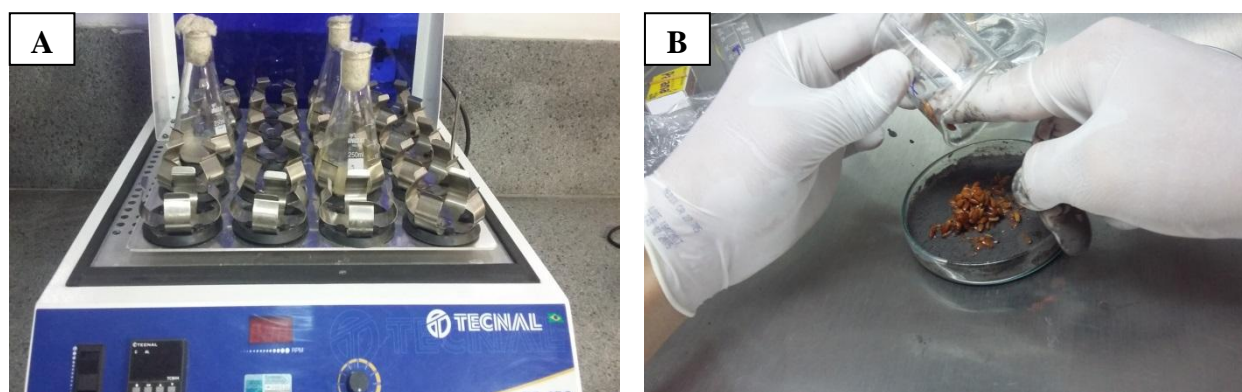


Figura 2. Inoculação de *G. diazotrophicus* em Erlenmeyers contendo meio DYGS, sob agitação de 150 rpm por 48 horas em agitador orbital (A) e inoculação de sementes de arroz vermelho com *G. diazotrophicus* em placas de Petri (B), Campina Grande, PB, 2016.

4.6. Semeadura e teste de germinação

Logo após o processo de inoculação das sementes e distribuição dos tratamentos, realizou-se a semeadura. Para tanto, utilizou-se duas folhas de papel germitest previamente umedecidos com água destilada autoclavada, na proporção de 2,5 vezes a massa do papel

secoautoclavado em caixa gerbox na proporção de 11cm x 11cm x 3cm (Figura 3A), onde 50 sementes de arroz vermelho por repetição de cada tratamento foram acondicionadas de forma equidistante e lacradas com filme de PVC nas caixas gerbox (Figura 3B) e foram mantidas em B.O.D (Biochemical oxygen demand) com temperatura de 27 °C, sob fotoperíodo 12 horas de luz branca, conforme recomendações das Regras para Análises de Sementes-RAS (BRASIL, 2009) conforme Figura 3C.



Figura 3. Papel germtest sendo umedecido com água destilada autoclavada (A), acondicionamento de sementes de arroz vermelho em caixa gerbox de forma equidistante (B) e mantidas em B.O.D a 27 °C com 12 horas de fotoperíodo (C), Campina Grande, PB, 2016.

Perpassadas às 24 horas em B.O.D deu-se início ao processo de contagem das sementes germinadas, prosseguindo-se diariamente até o décimo quarto dia. Aos sete dias após a semeadura, o substrato foi umedecido novamente com a mesma quantidade inicial de água.

4.7. Variáveis analisadas

4.7.1 Fisiológicas e de crescimento

Avaliou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) através da contagem diária do número de plântulas germinadas, até que esse número permanecesse constante, sendo considerada germinada a plântula visível na superfície do papel. Para determinar o índice de velocidade de germinação das plântulas (IVG), utilizou-se a expressão descrita por Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n} \quad (1)$$

Onde:

IVG= índice de velocidade de germinação.

G_1 , G_2 e G_n = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem, respectivamente.

N_1 , N_2 e N_n = número de dias da sementeira à primeira, à segunda e à última contagem, respectivamente.

Aos 5º (primeira contagem de germinação) e 14º (última contagem de germinação) dias após a sementeira (DAS) calculou-se a germinação (GER%) a qual representa a percentagem de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas a germinar sob determinadas condições experimentais, considerando semente germinada aquela que emitiu radícula e/ou parte aérea com aproximadamente 2mm de comprimento. Para tanto, utilizou-se expressão descrita por Labouriau (1983):

$$G\% = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

$\sum_{i=1}^n x_i$ = soma das sementes de cada repetição i germinadas, em relação ao número total de sementes (N) colocadas para germinar, sendo os dados expressos em percentagem.

A primeira contagem da germinação foi conduzida juntamente com o teste de germinação, sendo realizada apenas uma avaliação no quinto dia após a sementeira e os resultados foram expressos em percentagem de plântulas normais.

Utilizando-se as mesmas plântulas do teste de germinação, avaliou-se o comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento radicular (CRD) aos 14 DAS, com a mensuração da parte aérea e radícula de dez plântulas de cada repetição, com auxílio de régua graduada em centímetros. O comprimento médio das plântulas foi obtido pela soma das medidas de cada repetição, dividindo-se pelo número de plântulas mensuradas, com resultados expressos em centímetros (cm).

As plântulas utilizadas para mensuração do CPA e CRD foram utilizadas também para obtenção da massa fresca total (MFT) e massa seca total (MST), sendo a massa fresca total determinada em balança analítica. O material vegetal foi acondicionado em sacos de papel, os quais foram conduzidos a uma estufa de circulação de ar-forçado para secagem a 60°C por um período de 24 horas e posteriormente efetuou-se a pesagem em balança analítica, assim obtendo a massa seca total.

4.7.2 Bioquímicas

A atividade total da fosfatase ácida foi determinada aos 14 dias após a germinação, utilizando-se quatro repetições de cinco sementes para o tempo de 14 dias após a germinação. As

plântulas foram maceradas em almofariz contendo 20 mL de uma solução tampão de acetato de sódio 50 mM pH 5,0 em uma bandeja com gelo. A mistura foi centrifugada a 15.000 G durante 60 minutos a 0 °C em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi colocado em tubos de ensaio em banho de gelo, obtendo-se um extrato isento de células. Este extrato foi incubado a 70 °C durante 20 minutos, centrifugado a 10.000 G durante 30 minutos e o sobrenadante foi novamente recolhido. Alíquotas de 20 µL do mesmo e 80 µL de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 solução foram tomadas. Para o branco foi utilizado 100 mL de tampão de acetato de sódio 50 mM pH 5,0, 100 mL de p-nitrophenol foram adicionados a uma concentração de 2,5 mg/mL a cada tubo e incubou-se a 30°C durante 5 minutos. Após isso foram adicionados 900 µL de água destilada e bem homogeneizados. A atividade total da enzima foi determinada espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 400nm conforme Ching (1986) e os resultados expressos em $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

A atividade da α -amilase foi determinada aos 14 dias após a germinação, utilizando-se quatro repetições de cinco sementes para o tempo de 14 dias após a germinação. As plântulas foram maceradas em almofariz contendo 20 mL de uma solução tampão de acetato de potássio 50 mM pH 5,0, em uma bandeja com gelo. A mistura foi centrifugada a 15.000 G durante 60 minutos a 0 °C em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi colocado em tubos de ensaio em banho de gelo, obtendo-se um extrato isento de células. Este extrato foi incubado a 70 °C durante 20 minutos, centrifugado a 10.000 G durante 30 minutos e o sobrenadante foi novamente recolhido. Alíquotas de 20 µL do mesmo e 80 µL de acetato de potássio 50 mM, pH 5,0 solução foram tomadas. Para o branco foi utilizado 100 mL de tampão de acetato de potássio 50 mM, pH 5,0, 100 mL de amido foram adicionados a uma concentração de 1,7 mg/mL a cada tubo e incubou-se a 30°C durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de iodo - iodeto de potássio bem homogeneizados e adicionados 900µL de água destilada. A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 620nm, conforme Ching (1986) e os resultados expressos em $\text{mmg min}^{-1} \text{g}^{-1}$

4.7.3 Moleculares

As variáveis moleculares avaliadas foram: expressão relativa de α -amilase, fator de transcrição GAMYB e S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase. Para análise de expressão das mesmas, amostras de plântulas (parte aérea mais radículas) foram coletadas no último dia de experimento, mantidas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer (-80 °C). Posteriormente, foi realizada a extração de RNA das amostras coletadas, por meio da utilização do kit de extração PureLink[®] RNA Mini Kit (Ambion[®]) de acordo com as

recomendações do fabricante. O RNA total foi extraído a partir de um pool de 10 plântulas, de diferentes repetições, a fim de aumentar a eficiência no isolamento de sequências expressas, mRNA, relacionadas às respostas do processo de germinação. Após as extrações do RNA total da parte aérea mais radículas, as amostras foram quantificadas via espectrofotometria no aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare), e a análise da integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel desnaturante com concentração de 1% de agarose. As amostras de RNA com razão 260/280 nm entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas na síntese do cDNA por transcrição reversa a partir de 400 ng.µl⁻¹ de RNA total, utilizando o kit SuperScript™ II RT da Invitrogen.

A expressão dos genes selecionados foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR) com o Kit SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems) usando termocicladoriCycler (AppliedBiosystems). Cada reação de PCR continha 12,5 µL de Master mix SYBR Green 2X, 1mM de oligonucleotídeos específicos para cada gene (α -amilase, fator de transcrição GAMYB e S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase), conforme aTabela 1,e quantidades apropriadas de cDNA em uma reação com volume total de 25 µL. Os sistemas da reação de qPCR foram aquecidos a 95°C por 3 min e em seguida por 40 ciclos com passos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 60°C por 30 s. O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi empregado para a quantificação relativa do cDNA e o gene UBQ5 (ubiquitina)foi utilizado como controle endógeno. Os resultados correspondem à média de ensaios em triplicata e três repetições biológicas.

Todas as amplificações foram finalizadas com uma curva de dissociação, que permitiu verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de oligos ou qualquer outro produto inespecífico.

Tabela 1.Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise por qPCR,específicos para cada gene, expressos em plântulas (parte aérea mais radículas) de arroz vermelho inoculado com *Gluconacetobacter diazotrophicus*.Campina Grande, PB, 2016.

Nome do gene	Locustag	Sequência	Referência
Fator de transcrição GA-MYB	Os01g0812000	Senso GTGAAATCAGAGTGCGCGTC Anti- Senso TGGCGTACCGACAGAAGAAC Tamanho do Produto – 132pb	Esta dissertação
α -amilase	Os02g0765600	Senso CAGGGCTACGCATACATCCT Anti- Senso GATCACCTTGCCATCGATCT Tamanho do Produto – 166 pb	HE <i>et al.</i> , 2011
S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase	Os01g0323600	Senso AAGATCCCCGACAAGGAGAT Anti- Senso	HE <i>et al.</i> , 2011

		CATACTTGAGCGGCTTGACA	
		Tamanho do Produto – 183 pb	
Ubiquitina	Os01g0328400 a(UBQ5)	Senso ACCACTTCGACCGCCACTACT Anti- Senso ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	HE <i>et al.</i> , 2011
		Tamanho do Produto – 69 pb	

4.8. Análises estatísticas

Os dados das variáveis de resposta obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste (F) de Fisher a 5% de probabilidades de erro. Para as variáveis significativas ($p < 0,05$), foi aplicado teste de comparação de médias (Teste de Tukey). Realizou-se também análise por meio da correlação de Pearson. As análises estatísticas e preparo dos gráficos foram realizadas utilizando o software SIGMAPLOT 11.0 (SYSTAT SOFTWARE INC., 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contagem do número de células viáveis do inoculante e nas sementes

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 de *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 *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, utilizada no experimento. Campina Grande-PB, 2016.

Tratamentos	Meios de cultura	Log do nº células g^{-1}		
		Inoculante	Semente inoculada	Semente não inoculada
PAL5	LGI-P*	10,47	8,96	N.D.

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

5.2. Variáveis fisiológicas e de crescimento

De acordo com os resultados da análise de variância, verificou-se que os tratamentos exerceram efeito significativo ($p < 0,01$) sobre as variáveis fisiológicas: germinação (GER%), primeira contagem de germinação (PCG) e índice de velocidade de germinação (IVG).

Verificou-se aumento na percentagem de germinação das sementes de arroz vermelho embebidas em solução de ácido giberélico e inoculadas com *G. diazotrophicus* (SE H₂O + GA₃ + GD) e sementes não embebidas e inoculadas com *G. diazotrophicus* (SNE + GD), as quais não se diferenciaram estatisticamente entre si. Entretanto diferenciaram-se das sementes não embebidas (SNE), sementes embebidas em água (SE H₂O), sementes embebidas em solução de ácido giberélico (SE H₂O + GA₃) e sementes embebidas em água e inoculadas com *G. diazotrophicus* (SE H₂O + GD), sendo estas últimas estatisticamente iguais (Figura 4A).

As sementes de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus* embebidas e não embebidas, também promoveram aumentos significativos no índice de velocidade de germinação das sementes, onde os tratamentos (SE H₂O + GA₃ + GD), (SNE + GD) e (SE H₂O + GD) foram estatisticamente iguais, e diferentes de (SNE), (SE H₂O) e (SE H₂O + GA₃), onde (SE H₂O) e (SE H₂O + GA₃) são estatisticamente iguais e diferentes de (SNE) (Figura 4B).

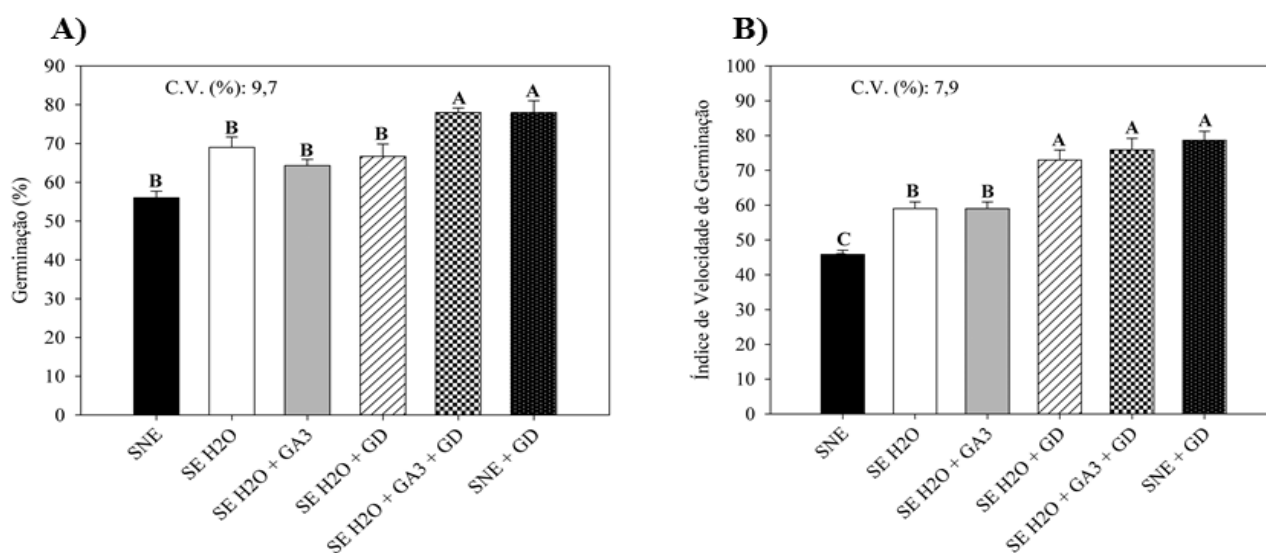


Figura 4. Germinação (A) e índice de velocidade de germinação (B) de sementes de arroz vermelho mediante inoculação com *G. diazotrophicus*. Campina Grande, PB, 2016.

Os aumentos registrados na Figura 4A foram de 28,7% e 28,2% para SNE + GD e SE H₂O + GA₃ + GD, respectivamente em relação à testemunha SNE.

É imperativo salientar que esse incremento da germinação de sementes de arroz vermelho se deve ao efeito da inoculação de *G. diazotrophicus*, tendo em vista que a percentagem de germinação das sementes não embebidas e inoculadas com a bactéria (SNE + GD) foi superior ao tratamento apenas com embebição em solução de ácido giberélico (SE H₂O + GA₃), cientificando a eficiência da bactéria na liberação de ácido giberélico, assim potencializando a germinação das sementes de arroz vermelho. Entretanto, a combinação de ácido giberélico e inoculação de *G. diazotrophicus*, causa pequeno decréscimo (1,2%) na percentagem de sementes germinadas, isso porque a atividade da bactéria pode ser reduzida devido à presença do ácido giberélico. O ácido giberélico é considerado na literatura como o hormônio da germinação, pois atua no crescimento do embrião, estimula o alongamento celular e faz a radícula romper o tegumento (LAVAGNINI *et al.*, 2014). *G. diazotrophicus* é uma bactéria promotora de crescimento vegetal (MENESES, 2010). A produção de fitohormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas, são os mais comuns mecanismos de promoção de crescimento vegetal (GRAY e SMITH, 2005). Segundo Bastian *et al.* (1998) *G. diazotrophicus* produz giberelinas e por tanto, pode promover aumentos da taxa de germinação de sementes (RODRIGUES *et al.*, 2012), devido a liberação do ácido giberélico. Espécies de bactérias promotoras de crescimento em plantas como *Pseudomonas synxantha*, *P. fluorescense* e *Bacillus* promovem efeitos positivos sobre a percentagem de germinação de sementes de arroz (SOARES *et al.*, 2012). Segundo Schlindwein *et al.* (2008) isolados de *Bradyrhizobium* sp., atuam como promotores de crescimento vegetal e melhora os parâmetros de germinação das sementes de alface. Contudo, *G. diazotrophicus* em mistura com quatro espécies de bactérias promotoras de crescimento em plantas (*Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*) não alteram a germinação de brotos de cana-de-açúcar (GIRIO *et al.*, 2015). No entanto, na literatura não se encontra trabalhos visando potencializar a germinação de arroz mediante a inoculação de *G. diazotrophicus*.

Maiores índices de velocidade de germinação de sementes de arroz vermelho foram constatados para SNE + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SE H₂O + GD com incrementos de 41,7%; 39,5% e 37,1%, respectivamente, em relação à testemunha SNE, de acordo com observado na Figura 4B.

Com o advento da liberação de ácido giberélico pela bactéria, obteve-se maior índice de velocidade de germinação, com isso a potencialização do processo de germinação das sementes, como já observado na figura 4A. Por outro lado, é importante destacar o contraste do tratamento SE H₂O + GD para as variáveis porcentagens de germinação e índice de velocidade de germinação, pois mesmo a germinação sendo igual com SE H₂O, o seu índice de velocidade de germinação foi superior, mostrando-se eficiente na diminuição do tempo para a germinação das sementes,

porque quanto maior for o valor do IVG melhor é o tratamento. O maior índice de velocidade de germinação do arroz-vermelho é fator importante para o estabelecimento de suas plântulas, assim, esta “infestante” ocupa logo os espaços e compete mais precocemente pelos recursos do ambiente em relação às plantas daninhas e outras cultivares de arroz e, por isso, leva vantagem na competição (DIARRA *et al.*, 1985). Nesse contexto, os maiores índices de velocidades de germinação aqui científicos mostram que independentemente de embeber as sementes ou não, a bactéria promove maiores aumentos nos parâmetros fisiológicos da germinação. Observando-se o IVG de SE H₂O + GA₃ (59,01) e SE H₂O + GD (72,9), nota-se um aumento expressivo, onde se verificou-se um incremento de 19% para o tratamento das sementes embebidas em água e inoculadas com *G. diazotrophicus*.

Segundo Girioet al. (2015) a utilização *G. diazotrophicus* em mistura com quatro espécies de bactérias promotoras de crescimento em plantas (*Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*) em cana-de-açúcar, promove maiores de velocidade de brotação (IVB), com isso melhorando os caracteres agrônômicos da cultura em campo. Matos et al. (2015) também relataram que efeitos significativos positivos sobre o índice de velocidade de germinação de mini-toletes de cana-de-açúcar, inoculados com *Bradyrhizobium e Rhizobium*, que também são bactérias promotoras de crescimento vegetal. O índice de velocidade de germinação de sementes de arroz de diferentes qualidades fisiológicas inoculadas com rizobactérias é influenciado positivamente, sendo tais efeitos significativos (SOARES *et al.*, 2014).

Na primeira contagem de germinação, aos cinco dias, o maior número de sementes germinadas (64,6%) foram constatadas para as sementes não embebidas em água e inoculadas com *G. diazotrophicus* (SNE + GD). Entretanto, este valor não difere estatisticamente dos valores 57,3, 60 e 59,3%, científicos para os tratamentos SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD, respectivamente. Porém, estes valores supracitados diferem estatisticamente dos valores registrados para os tratamentos das sementes não embebidas em água (SNE) e das sementes embebidas em água (SE H₂O) com 46% e 48% de sementes germinadas, respectivamente (Figura 5).

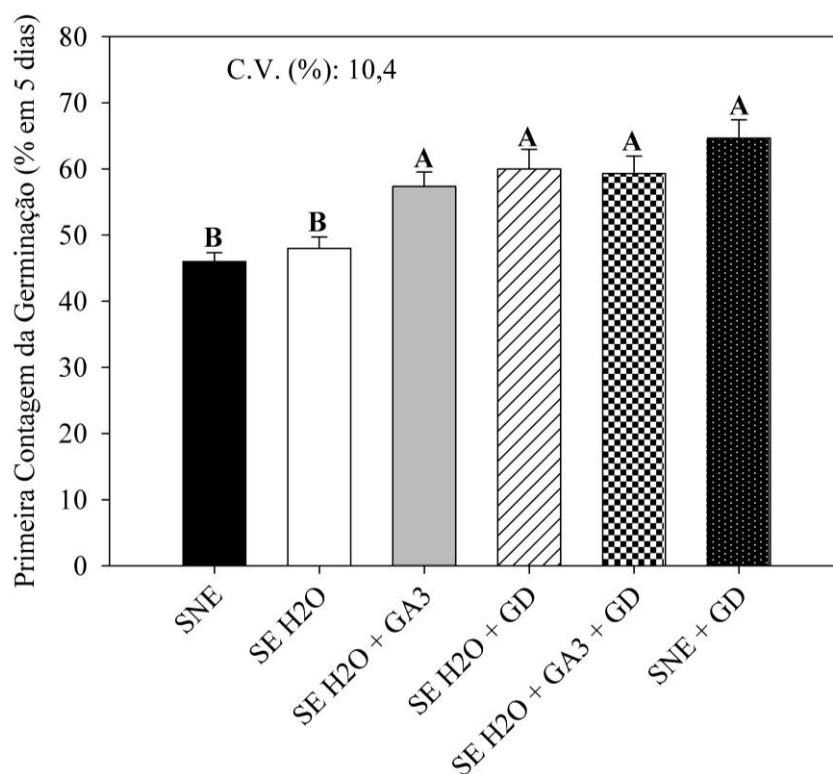


Figura 5. Primeira contagem de germinação de sementes de arroz vermelho aos cinco dias após a semeadura, inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* nas sementes. Campina Grande, PB, 2016.

Comparando-se os tratamentos das sementes não embebidas e inoculadas com a bactéria (SNE + GD) com as sementes não embebidas e não inoculadas (SNE), verifica-se um incremento de 28,7% na percentagem de sementes germinadas aos cinco dias após a semeadura. Menores efeitos foram observados para os tratamentos SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD, com incrementos de 19,7, 23,3 e 22,4%, respectivamente, em relação ao tratamento das sementes não embebidas (SNE), conforme demonstrado na Figura 5. Nesta figura, visualizam-se também incrementos de 16,2; 20; 19 e 25,6% para os tratamentos SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD, respectivamente, em relação ao tratamento SE H₂O. Analisando-se ainda a Figura 5, percebem-se incrementos de 11,3, 7,1 e 8,2% na primeira contagem de germinação para o tratamento das sementes não embebidas e inoculadas (SNE + GD), em relação aos tratamentos SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD.

Os efeitos observados devem-se a capacidade da *G. diazotrophicus* estabelecer intrínsecas relações de associação com seus hospedeiros (GILLIS *et al.*, 1989).

Acrescente-se que, por se tratar de uma bactéria diazotrófica endofítica, *G. diazotrophicus* coloniza os tecidos internos das plantas, estimulando o processo de germinação das sementes, através de diferentes mecanismos tais como produção de hormônio de crescimento

como asgiberelinas e auxinas, ácido indol acético, dentre outros (BASTIAN *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2012; SCHLINDWEIN *et al.*, 2008). Assim sendo, corroborando com estes autores, a bactéria atuou na primeira contagem de germinação liberando ácido giberélico, promovendo maiores incrementos na porcentagem de sementes germinadas, o que também foi constatado por Soares *et al.* (2012) e Soares *et al.* (2014) estudaramo tratamento de sementes de arroz com rizobactériaspromotoras de crescimento vegetalverificaram incrementos positivos sobre a primeira contagem da germinação aos 5 dias após a sementeira.Segundo Araújo *et al.* (2010) a inoculação com bactérias diazotróficas promovem incrementos significativos na primeira contagem de germinação e aumenta a velocidade de germinação das sementes de arroz das cultivares IR42 e Zebu Branco.Dartora *et al.* (2013) avaliando a germinação de milho e trigo, verificaram diferenças significativas na primeira contagem de germinação entre as plantas inoculadas e não inoculadas com duas estirpes de bactérias diazotróficas, sendo que as sementes inoculadas obtiveram maior porcentagem de germinação na primeira contagem (4º dia após sementeira). Estes autores afirmam que, a inoculação influencia a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de trigo e milho, sendo evidentes os benefícios da inoculação conjunta de estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*.

Analisando-se os dados deste trabalho constatou-se que, os tratamentos influenciaram os resultados do comprimento radicular (CRD), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca total (MFT) e massa seca total (MST) de plântulas de arroz vermelho.

Verificou-se que, os valores mais expressivos de comprimento radicular (4,6 cm) e comprimento da parte aérea (7,62cm) foram registrados para o tratamento das sementes de arroz vermelho não embebidas e inoculadas com *G. diazotrophicus*(SNE + GD) (Figura 6A e B). Essas diferenças observadas representaram um incremento de 49,5;48,2; 10,7; 14,9 e 47,8% de comprimento radicular em relação à SNE, SE H₂O, SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD, respectivamente(Figura 6A). Para o comprimento da parte aérea o tratamento SNE + GD promoveu incrementos de 69,6; 66,1; 35,9; 5,24 e 16,1% em relação aos tratamentos SNE, SE H₂O, SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD, respectivamente(Figura 6B).

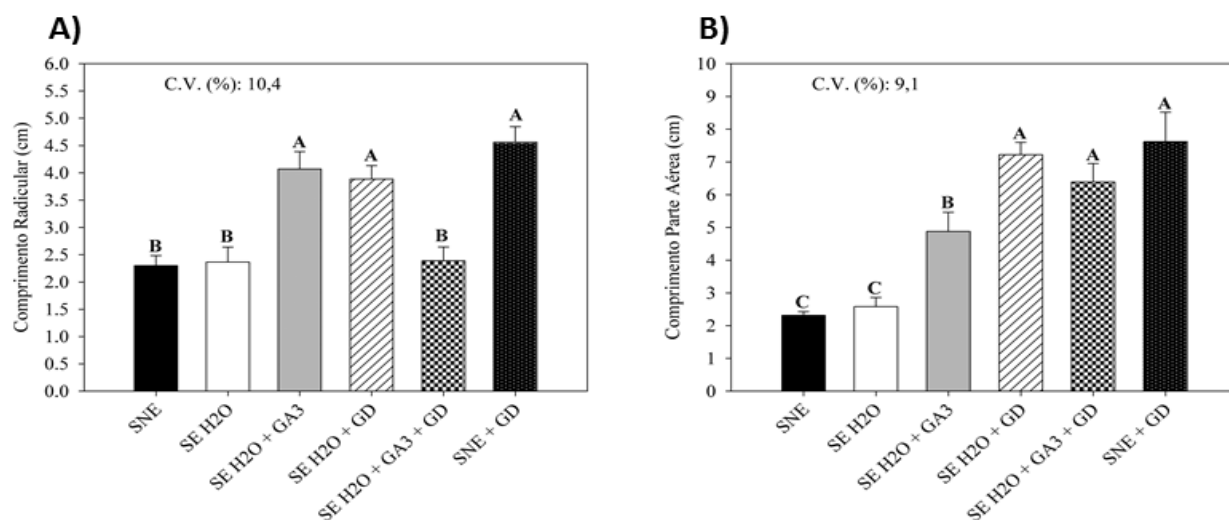


Figura 6. Comprimento radicular (A) e comprimento da parte aérea (B) de plântulas de arroz vermelho mediante a inoculação de *G. diazotrophicus* nas sementes. Campina Grande, PB, 2016.

Conforme as Figuras 6A e B, os menores valores de comprimento da radícula e parte aérea foram registrados para as sementes não embebidas, pois não tiveram nenhum estímulo. Entretanto, mesmo as sementes sendo estimuladas com a embebição em água por 24 horas, não promoveram nenhum incremento nos comprimentos da radícula e parte aérea das plântulas de arroz vermelho. Contudo, os tratamentos SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD promoveram incrementos significativos de 43,4 e 40,4%, respectivamente, e para o comprimento radicular os tratamentos SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD incrementaram em 52,6; 68 e 63,8%, respectivamente, em relação ao tratamento das sementes não embebidas e não inoculadas (SNE).

Os achados científicos deste trabalho corroboram com os já relatados por Grohset al. (2012) em que a aplicação do ácido giberélico é eficiente em estimular a germinação de diferentes cultivares de arroz, resultando em maior crescimento radicular e de parte aérea. Para Rodrigues et al. (2015), o aumento das doses de biorreguladores aplicadas nas sementes influenciam positivamente o crescimento da parte aérea das plântulas de arroz. Em trigo, também foram constatadas diferenças significativas para os comprimentos da parte aérea e radicular com aplicação de ácido giberélico (CATO, 2006). Segundo Georget al. (2014), os hormônios vegetais (citocinina, giberelina e auxina) promovem diferenças gritantes no desenvolvimento inicial das plantas de trigo.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal, neste caso a *G. diazotrophicus*, exercem efeitos positivos sobre as mesmas (AMORIM e MELO, 2002; DEY *et al.*, 2004) promovendo incrementos significativos e positivos nos comprimentos radicular e da parte aérea de plantas (RODRIGUES *et al.*, 2012). Dutra et al. (2014), constataram que a inoculação de sementes de

arroz vermelho aumentam significativamente o tamanho das plantas e concluem que *G. diazotrophicus* apresenta potencial de uso como biofertilizante para experimentação e seleção a campo.

No metabolismo dessa espécie de bactéria destacam-se a tolerância a altas concentrações de sacarose; acidez e habilidade de excretar o nitrogênio fixado, conforme demonstrado por Cojhoet al. (1993), onde o nitrogênio fixado é tido como sendo um dos elementos mais importantes para a produtividade de diversas culturas (GUIMARAES *et al.*, 2003). Isto se deve ao fato do nitrogênio ser um dos principais constituintes de diferentes moléculas, como os ácidos nucléicos, aminoácidos, bases nitrogenadas, clorofila, dentre outros (FERREIRA, 2008, MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), sendo que é através da utilização de microrganismos que fixam nitrogênio do ar, que o crescimento e o desenvolvimento do vegetal podem ser melhorados. Além disso, estudos mostram que a aplicação deste microrganismo em plantas de arroz, leva a produção de grãos com maior conteúdo protéico (SILVEIRA, 2008).

Segundo Bastianet al. (1998), as bactérias *H. seropedicae* e *G. diazotrophicus* produzem giberelinas e ácido indol acético (AIA), desta forma sendo possível explicar alguns efeitos benéficos destas bactérias para as plantas. Além da capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio, estimulam o crescimento destas através de diferentes mecanismos tais como produção de hormônios de crescimento como a auxina e outros hormônios e também por acelerar processos biológicos como a mineralização (REIS *et al.*, 2000; SOMERS e VANDERLEYDEN, 2004). Desta forma, as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* terão maior desenvolvimento, com isso, maiores índices de produção em campo. Portanto, a fixação e liberação do nitrogênio para a planta resultará na formação de moléculas que atuarão no metabolismo da planta, com funções diretas no crescimento do vegetal, destacando-se o comprimento da parte aérea e radicular, como já científico neste trabalho. A associação de *G. diazotrophicus* com plantas de arroz é conhecida e estudos já demonstraram a capacidade de colonização de plântulas de arroz por essa bactéria (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2005; ROUWS *et al.*, 2010; MENESES *et al.*, 2011). Existem evidências crescentes de que esta bactéria afeta as concentrações hormonais nas raízes, e também podem alterar a sinalização de longa distância entre a raiz e a parte aérea (BELIMOV *et al.*, 2009), assim promovendo maior comprimento radicular e da parte aérea. Outra possível explicação é que o nitrogênio fixado pela bactéria, antes de ser absorvido, o nitrogênio é retirado do ar e transformado em amônia solúvel em água, que é utilizado diretamente pela planta, quando ocorre o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN).

Procedendo-se ainda com os resultados das variáveis de crescimento, verificou-se que o comportamento das plântulas com sementes inoculadas foram maiores, sendo evidenciada maior

alocação de massa fresca total (0,35 g) e massa seca total (0,4 g) para o tratamento SNE + GD, embora esses valores não tenham diferido estatisticamente dos valores médios de 0,3 e 0,4 g nos tratamentos SE H₂O + GD e SE H₂O + GA₃ + GD para a massa fresca total e massa seca total, respectivamente (Figura 7AB). Por outro lado, o acúmulo de massa fresca total das plântulas foi incrementado em 40% com os tratamentos SE H₂O + GD e SE H₂O + GA₃ + GD e em 48,5% para SNE + GD, em relação ao tratamento de sementes não embebidas e não inoculadas (SNE) (Figura 7A).

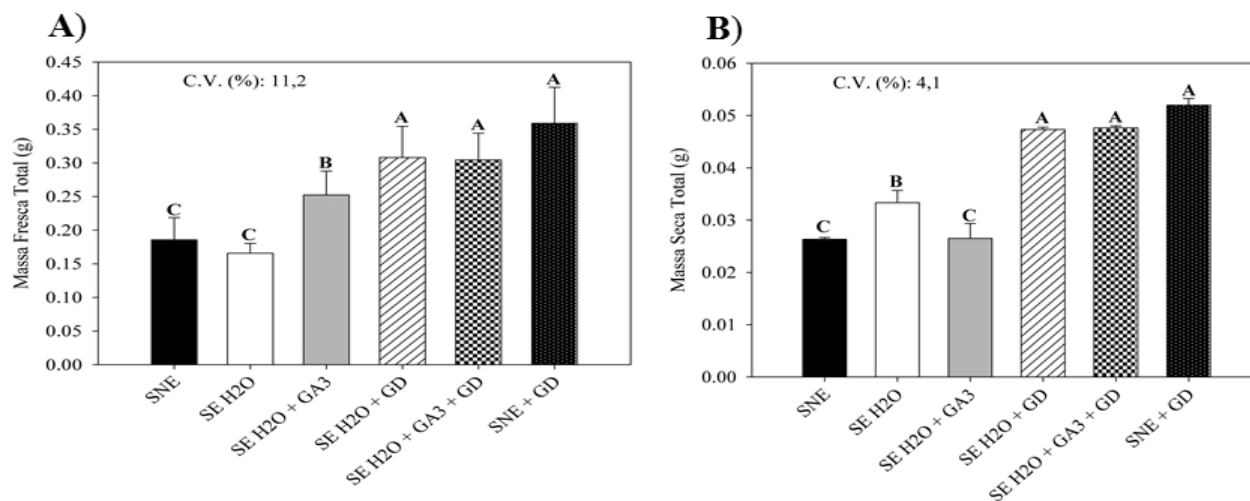


Figura 7. Massa fresca total (A) e massa seca total (B) de plântulas de arroz vermelho com sementes não embebidas em água, embebidas em água e em solução de ácido giberélico e inoculadas com *G. diazotrophicus*, aos 14 dias após semeadura. Campina Grande, PB, 2016.

Comparando-se o tratamento SE H₂O + GD com SE H₂O, observa-se um incremento de 46,6% de massa fresca total e aumento de 16,6% de massa fresca total para SE H₂O + GD quando comparado com SE H₂O + GA₃. Entretanto, o tratamento com sementes embebidas em água (SE H₂O) reduziu a massa fresca em 12% quando comparadas as sementes não embebidas (SNE) conforme observado na Figura 7A.

A relação entre o tratamento SNE e SNE + GD pode ser observada de forma mais nítida e bem compreendida, onde mostra que as folhas estão mais vigorosas para o tratamento de sementes não embebidas em água e inoculadas com a bactéria (Figura 8B) do que as sementes não embebidas e não inoculadas (Figura 8A).



Figura 8. Plântulas de arroz vermelho, não embebidas e não inoculadas (SNE) (A) e não embebidas e inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (SNE + GD) (B), aos 14 dias após semeadura. Campina Grande, PB, 2016.

Analisando-se os resultados da massa seca total, verificou-se incrementos de 50% para os tratamentos SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e de 61,5 para o tratamento SNE + GD em relação ao tratamento das sementes não embebidas e não inoculadas SNE, e incrementos de 25% para os tratamentos SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e de 42,3% para SNE + GD em relação ao tratamento das sementes embebidas em água SE H₂O, conforme mostrada na Figura 7B. Porém, a embebição das sementes em solução de ácido giberélico (SE H₂O + GA₃) foi numericamente igual ao tratamento das sementes não embebidas (SNE), com massa seca total de 0,02 g, ou seja, este tratamento não ajudou as plântulas de arroz vermelho, ao contrário, causou redução da massa seca total em 33,3% quando comparado às sementes embebidas em água (SE H₂O). Este ocorrido se deve ao efeito potencializador de *G. diazotrophicus*, que além da produção de ácido giberélico para atuação na sinalização celular, alongamento celular e turgescência vacuolar, foi efetiva em aumentar os níveis de nitrogênio para planta, pois os níveis de nitrogênio podem aumentar de acordo com a colonização da bactéria nos tecidos das plântulas em função do tempo. Acrescente-se que, quando comparado os valores médios (0,052 g) da massa seca total do tratamento das sementes não embebidas e inoculadas com *G. diazotrophicus* (SNE + GD) com os valores médios (0,04) das sementes embebidas em água e inoculadas com a bactéria (SE H₂O + G) e sementes embebidas em solução de ácido giberélico e inoculadas com a bactéria (SE H₂O + GA₃ + GD), embora este contraste não seja significativo, verificou-se um incremento 23%. Esses valores foram superiores aos observados por Mishra et al. (2006), que estudaram o efeito de dois isolados de rizóbios em arroz e obtiveram 5,14% de incremento na matéria seca da parte aérea das plantas. Em outros

trabalhos, foram observados incrementos de 19% (BISWAS *et al.*, 2000) e de 32% (CHI *et al.*, 2005) na produção de matéria seca de arroz inoculado com diferentes estirpes de rizóbios.

Plantas tratadas com bactérias osmotolerantes proporcionaram maior diferença de matéria seca entre as raízes de plantas tratadas e não tratadas, mesmo em condições de menor disponibilidade de água (YUWONO *et al.*, 2005). Segundo Osorio Filho *et al.* (2016), a inoculação de sementes de arroz com rizóbios incrementou a produção de matéria seca da parte aérea das plantas de arroz. Segundo Conceição *et al.* (2008), sementes de milho, inoculadas com a bactéria *H.seropedicae*Z67 aumentou a massa de matéria fresca das raízes em 38%, em relação ao controle. Szilagyi-Zecchin *et al.* (2015), verificaram que as sementes de tomateiro tratadas com *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, promoveu o aumento do volume da parte aérea das plântulas. *G. diazotrophicus* em mistura com outras espécies de bactérias (*A. amazonense*, *B. tropica*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*) produzem maior massa de matéria seca das gemas, massa seca das raízes, parte aérea e massa seca total (GIRIO *et al.*, 2015). Neste trabalho, as sementes de arroz vermelho, independentemente da sua qualidade fisiológica, inoculadas com *G. diazotrophicus*, são eficientes em promover maior alocação de massa fresca total e massa seca total. Isso provavelmente devido à ação das bactérias diazotróficas sobre o alongamento celular, pela turgescência vacuolar (CONCEIÇÃO *et al.*, 2008).

5.3. Variáveis bioquímicas

De posse dos resultados obtidos a partir da análise de variância, verificaram-se efeitos significativos dos tratamentos sobre as atividades enzimáticas da alfa amilase (APA) e fosfatase ácida (FOA). Os tratamentos SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD foram estatisticamente iguais e diferiram dos tratamentos SNE, SE H₂O e SE H₂O + GA₃ na atividade da α -amilase e da fosfatase ácida (Figura 9A e B). Acrescente-se que, os tratamentos SE H₂O e SE H₂O + GA₃ não diferiram estatisticamente entre si, porém diferiram do tratamento com as sementes não embebidas e não inoculadas (SNE), para as atividades da α -amilase e da fosfatase ácida (Figura 9A e B).

A atividade da α -amilase foi maior para o tratamento das sementes não embebidas em água e inoculadas com *G. diazotrophicus* (SNE + GD) com valor médio de 92,1 mg min⁻¹ g⁻¹. Este valor representa um acréscimo de 38,5% na atividade da α -amilase nas plântulas de arroz vermelho em relação ao tratamento das sementes não embebidas e não inoculadas (SNE), com valor médio de 56,6 mg min⁻¹ g⁻¹ (Figura 9A).

Verificou-se ainda, incrementos de 26; 26; 6 e 3% na atividade da α -amilase para o tratamento (SNE + GD) em relação aos tratamentos SE H₂O, SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE

H₂O + GA₃ + GD, respectivamente. Os tratamentos SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD aumentaram a atividade da α -amilase em 21,7 e 24,2%, respectivamente em relação aos tratamentos SE H₂O e SE H₂O + GA₃, em 34,5 e 36,6% em relação ao tratamento das sementes não embebidas e não inoculadas (SNE), seguidamente (Figura 9A). Os tratamentos SE H₂O e SE H₂O + GA₃ aumentaram em 15% a atividade da α -amilase em relação ao tratamento (SNE), conforme a Figura 9A.

Esses efeitos, acima relatados, atribuem-se a *G. diazotrophicus* que durante o processo de colonização, ao que parece produziu giberelinas. Esta, então, migra via endosperma até a camada aleurona induzindo à síntese de α -amilase. A α -amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável pela atividade amilótica, hidrolisando o amido em glicose (carboidratos), aumentando a taxa de respiração e do metabolismo, para o desenvolvimento do embrião (por mitose) e formação dos tecidos (FRANCO *et al.*, 2002; MAGALHAES e VIERIRA, 2008) e sua atividade é máxima com cerca de dez dias após início da germinação (BEWLEY e BLACK, 1994), sendo constatada atividade neste trabalho aos 14 dias. Acrescente-se que, além de ter produzido giberelina, *G. diazotrophicus* é capaz de potencializar a atividade da α -amilase. Estudos reportados na literatura apontam que, microrganismos promotores de crescimento vegetal promovem aumentos das concentrações de giberelinas. Portanto em decorrência desse aumento, também há aumento na atividade da α -amilase. Silva (2012) estudando a produção de amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando torta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*) como substratos, observaram máxima produção das amilases com valores de 3.393 U.mL⁻¹ com a farinha de pupunha e 196 U.mL⁻¹ com a torta de macaúba como substratos. Oliveira (2010) selecionando microrganismos endofíticos com potencialidades para a biorremediação de ambientes contaminados verificou uma atividade amilolítica somente para o isolado AB4 de *Bacillus cereus*.

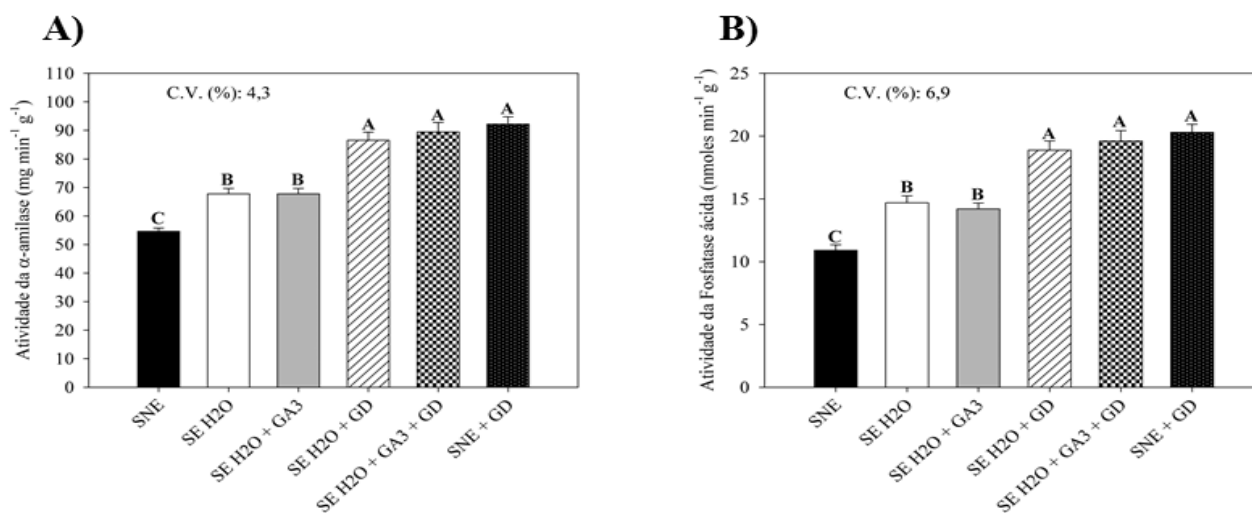


Figura 9. Atividade da α -amilase (A) e atividade da fosfatase ácida de plântulas de arroz vermelho mediante a não embebição e embebição em água, em solução de ácido giberélico e inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* nas sementes. Campina Grande, PB, 2016.

Observando-se a Figura 9B, verifica-se que, os tratamentos SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD não promoveram diferenças estatísticas entre eles, porém foram diferentes dos tratamentos SNE, SE H₂O e SE H₂O + GA₃, em que estes dois últimos se diferenciaram do tratamento SNE.

Os maiores efeitos foram observados para a atividade da fosfatase ácida, em todos os tratamentos quando comparados ao tratamento SNE. Estes efeitos foram superiores aos valores registrados para a atividade da α -amilase, conforme Figura 9A e B.

A atividade da fosfatase ácida foi maior para o tratamento das sementes inoculadas com *G. diazotrophicus* e não embebidas em água (SNE + GD) com valor médio de 20,02 nmol min⁻¹ g⁻¹, representando um aumento de 46% na atividade da fosfatase ácida nas plântulas de arroz vermelho, comparadas as sementes não embebidas e não inoculadas (SNE), conforme já apresentado na Figura 9B. Nesta figura, percebem-se ainda incrementos significativos em 25,3; 22,6; 42 e 44,3 na atividade da fosfatase ácida para os tratamentos SE H₂O, SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD, respectivamente em relação ao tratamento SNE.

Acrescente-se ainda que os tratamentos SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD potencializaram incrementos de 25, 28 e 30%, respectivamente, na atividade da fosfatase ácida em relação ao tratamento SE H₂O + GA₃ e incrementos de 22,3, 25,5 e 27,7% em relação ao tratamento SE H₂O, seguidamente.

Na planta, a utilização das reservas de fósforo envolve as fosfatases ácidas. O fósforo é constituinte da molécula de fosfolípido (essencial às membranas celulares), açúcares fosfatados,

nucleotídeos (NAD, FAD, ATP, UTP, GTP), coenzimas (CoA e FAD) e ácidos nucleicos (DNA, RNA). Além disso, participam da respiração, transferência de energia, da divisão celular e crescimento das células, estimulando o crescimento e formação das raízes das plantas (MARENCO e LOPES, 2011). O fósforo pode ser mineralizado por microrganismos, tornando-o disponível para as plantas como fosfato solúvel. Esta mineralização se dá através de fosfatases ácidas e alcalinas das bactérias promotoras de crescimento vegetal, envolvendo a defosforilação através da hidrólise de ligações fosfo-éster e fosfoanidrido (GYANESHWAR *et al.*, 2002).

Nesse sentido, é importante ressaltar que, os aumentos significativos da atividade da fosfatase ácida nas plântulas de arroz vermelho observados neste trabalho, foi atribuído a atividade da *G. diazotrophicus* inoculada nas sementes, haja vista que esta bactéria tem a habilidade de solubilizar fosfato. Outro fato que sustenta esta hipótese é que o tratamento das sementes embebidas com ácido giberélico (SE H₂O + GA₃) causou redução na atividade da fosfatase ácida em 3,5% em relação ao tratamento das sementes embebidas em água e não inoculadas (SE H₂O), embora não tenha se diferenciado estatisticamente, mostrando que o ácido giberélico foi nulo em relação a atividade da fosfatase ácida. Por outro lado, as giberelinas produzidas pela *G. diazotrophicus* provavelmente atuaram incrementando no conteúdo da enzima rubisco e na atividade da enzima sacarose-fosfato-sintase e frutose 1,6-bifosfatase, que por sua vez, estimulam um aumento da taxa fotossintética, bem como aumenta a eficiência no uso de nitrogênio fixado pela bactéria.

A fotossíntese é essencial para a sobrevivência das plantas, sendo o principal processo de fornecimento de carbono para o crescimento e desenvolvimento vegetal (DORNHOFF e SHIBLES, 1970), demandando mais da metade do nitrogênio existente na folha, pela enzima rubisco, correlacionando-se positivamente com o teor de clorofila nas folhas, com a fotossíntese e por fim com a produtividade das culturas (LAMBERS *et al.*, 1998; SCHADCHINA e DMITRIEVA, 1995). A redução da fotossíntese deve-se as limitações no suprimento e utilização de CO₂, energia luminosa e de fosfatos (FARQUHAR e SHARKEY, 1982), em que este último teve a sua atividade aumentada, conforme Figura 9B.

A atividade da fosfatase ácida está envolvida na mobilização de açúcares reduzidos, do endosperma ao embrião, promovendo o desenvolvimento do embrião, e posteriormente a germinação e crescimento do vegetal. Estes açúcares são utilizados como fonte primária de energia na retomada do crescimento embrionário, inicialmente determinado pela aquisição de água, seguida pela mobilização de reservas para a formação de novas estruturas celulares ao longo do processo de germinação (LABORIAU, 1970).

Neste contexto, mesmo as sementes que não foram embebidas em água e foram inoculadas com *G. diazotrophicus* (SNE + GD), tiveram água suficiente no substrato (papel germtest) para desencadear todo este processo. Entretanto, *G. diazotrophicus* aumenta os níveis de prolina, glicina betaína e trealose em arroz vermelho sob deficiência hídrica (BEZERRA, 2014). Estas moléculas atuam no ajuste osmótico, proteção da membrana plasmática e membranas dos tilacóides, assim mantendo a eficiência fotoquímica durante a fotossíntese (ASHRAF *et al.*, 2011; ASHRAF e FOOLAD, 2007; LI *et al.*, 2014; MAGAZU *et al.*, 2012), o que não afetou a atividade da fosfatase ácida. Soares *et al.* (2012) estudando a atividade das enzimas fosfatases ácidas e alcalinas, em solo cultivado com milho, verificaram que a inoculação de bactérias diazotróficas em rochas pode aumentar a produção de enzimas fosfatase, assim disponibilizando fósforo no solo. Rameshet *al.* (2014), demonstraram aumento expressivo na atividade da fosfatase ácida ao inocular *Bacillus aryabhata* em soja. Busato *et al.* (2012), observaram aumento da atividade fosfatase ácida e do teor de fósforo disponível em vermicomposto inoculado com *Burkholderia silvatlantica*, *Burkholderia* spp. e *H. seropedicae*, no estágio inicial da vermicompostagem. Sarathamba *et al.* (2010), observaram que os compostos insolúveis de fosfatos zinco foram efetivamente solubilizados e a maior absorção desse nutriente ocorreu por plantas de milho inoculadas com *G. diazotrophicus*. Diante do exposto, é importante pontuar que esta bactéria atua diretamente no metabolismo da planta, solubilizando fosfato, e aumentando a atividade da fosfatase ácida, haja vista que a atividade da fosfatase ácida é aumentada em condições de deficiência de fósforo, em que o experimento conduzido em caixas gerbox, apenas com o fósforo presente na água do substrato, possivelmente fazendo com que a bactéria solubilizasse fosfato e aumentasse a atividade da fosfatase ácida.

5.4. Correlação de Pearson entre as variáveis bioquímicas, fisiológicas e de crescimento

Para confirmar o comportamento das variáveis anteriormente discutidas, foram estimadas correlações entre as variáveis avaliadas que foram constatadas correlações significativas positivamente (Figura 10).

Das correlações estimadas, algumas merecem destaque, como fosfatase ácida (FOA) e α -amilase (APA) que tiveram coeficiente de correlação (0,993), ou seja, próximo de 1 (um), mostrando alta correlação positiva (Figura 10). Acrescente-se que, incremento de fosfatos aumenta, significativamente a produção de amilases por micro-organismos (GUPTA *et al.*, 2003), como já evidenciado neste trabalho.

Ressalte-se ainda que, APA e FOA correlacionaram-se positivamente com o IVG, com alto coeficiente de correlação, indicando que estes atuaram hidrolisando o amido em glicose e

favorecendo o desenvolvimento do embrião, e em consequência disso aumentaram o índice de velocidade de emergência (IVG) das plântulas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus*, conforme já apresentado na Figura 4B. Nesse sentido, o aumento da atividade de α -amilase (APA) e fosfatase ácida (FOA) também se correlacionaram com a percentagem e primeira contagem de germinação (GER e PCG), de acordo com a Figura 10, indicando maior potencialização da germinação das plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus*, já observado na Figura 4A.

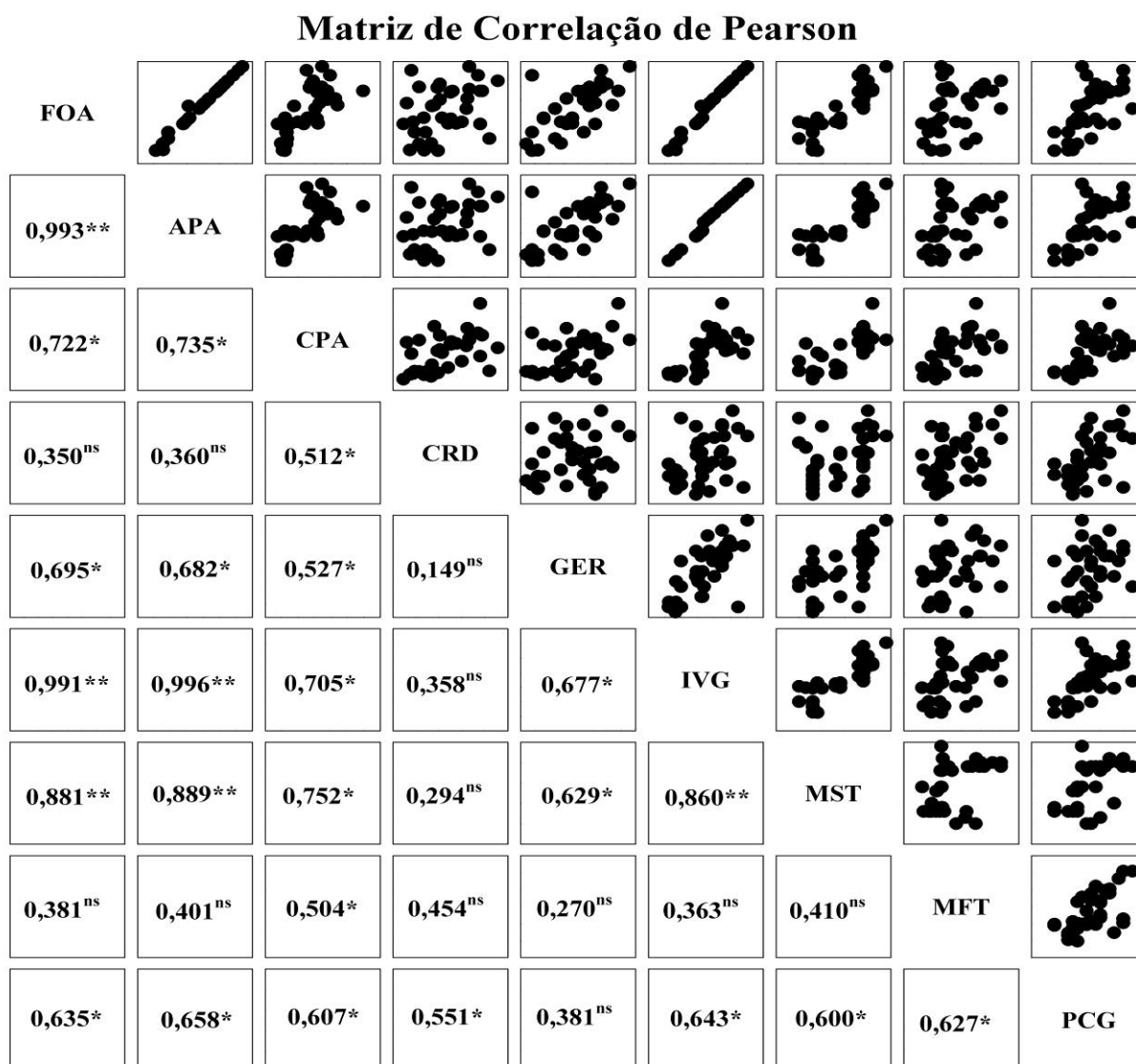


Figura 10. Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis: fosfatase ácida (FOA), α -amilase (APA), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento radicular (CRD), % germinação (GER), índice de velocidade de germinação (IVG), massa seca total (MST), massa fresca total (MFT) e primeira contagem de germinação (PCG) de plântulas de arroz vermelho com sementes não embebidas em água, embebidas em água e em solução de ácido giberélico e inoculadas com *G. diazotrophicus*, aos 14 dias após semeadura. Campina Grande, PB, 2016.

Observou-se ainda na Figura 10, que há correlação entre o índice de velocidade de germinação (IVG), germinação (GER), primeira contagem de germinação (PCG) e o comprimento da parte aérea (CPA), haja vista que plântulas que germinaram mais rápido, a bactéria atuou como fixadora de nitrogênio, assim promovendo maior crescimento da parte aérea, e em decorrência disso maior massa seca total (MST) e maior massa fresca total (MFT). Contudo, não houve correlações significativas para a fosfatase ácida (FOA) e α -amilase (APA) com o comprimento radicular (CRD) e massa fresca total (MFT). Isto pode ser explicado devido estas enzimas atuarem durante a germinação das plantas.

5.5. Variáveis moleculares

De acordo com os dados obtidos a partir da análise $2^{-\Delta\Delta CT}$, verificou-se efeito significativo para a expressão relativa dos genes: fator de transcrição GAMYB (Os01g0812000), α -amilase (Os02g0765600), S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase (Os01g0323600).

Verificou-se diferença significativa dos tratamentos SE H₂O + GD e SNE + GD, em relação aos demais tratamentos, para a expressão relativa do fator de transcrição GAMYB (Os01g0812000) e S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase (Os01g0323600) (Figura 11). Para expressão relativa de α -amilase (Os02g0765600) em plântulas de arroz vermelho, os tratamentos SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD não se diferenciaram, entretanto, promoveram diferenças significativas em relação aos tratamentos SNE e SE H₂O. Analisando-se ainda a Figura 11, nota-se que, os tratamentos SE H₂O + GA₃ e SE H₂O + GA₃ + GD foram estatisticamente iguais, porém diferiram dos tratamentos SNE e SE H₂O, para a expressão relativa do fator de transcrição GAMYB (Os01g0812000) e S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase (Os01g0323600).

O tratamento SNE + GD promoveram incrementos de 97% na expressão relativa do fator de transcrição GA-MYB, de 86% na expressão de α -amilase e 89% na expressão de S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase, em relação ao tratamento das sementes não embebidas e não inoculadas (SNE). O SE H₂O + GD promoveu acréscimos de 97; 85 e 89% na expressão relativa do fator de transcrição GA-MYB, α -amilase e de S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase, respectivamente, em relação ao tratamento SNE. Verificaram-se ainda aumentos de 84, 20 e 12% na expressão relativa do fator de transcrição GA-MYB, para o tratamento SE H₂O + GD e SNE + GD quando comparado com os tratamentos SE H₂O, SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GA₃ + GD, respectivamente (Figura 11). De acordo com AcharDET al. (2004), o ácido giberélico (GA₃) participa na regulação do OsGAMYB e OsGAMYBL1 por controlar o nível miR159, atuando na sinalização em células de aleurona de cereais. Segundo Tshiet al. (2006), os fatores de transcrição OsGAMYB regula a expressão de quase todos os genes em células de aleurona de arroz. Nesse sentido, OsGAMYB

atuaram na formação do RNA mensageiro, juntamente com a RNA-polymerase, formando a informação de qual proteína deveria ser sintetizada, isso no núcleo da célula. No ribossomo as trincas (anti-códons) de aminoácidos trazidas pelo mRNA, que por sua vez interagiram com as trincas (códons) do tRNA, que posteriormente o RNA ribossômico através de ligações polipeptídicas, formaram as proteínas. Partindo deste ponto, o aumento da atividade de α -amilase observada neste trabalho é claramente atribuída ao aumento de OsGAMYB, pois segundo Gubler et al. (1995) OsGAMYB é um regulador transcricional de expressão da α -amilase em células de aleurona de cevada, e outras proteínas ortólogas já foram identificadas em poáceas, tais como arroz, trigo e joio (GUBLER *et al.*, 1997; GOCAL *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001). Kaneko et al. (2004) estudando a função de GAMYB em arroz, verificaram que 75% de sementes testadas, induziram atividade de α -amilase, resultado que corroboram com os achados deste trabalho. É importante pontuar que as perdas de OsGAMYB prejudica não só a expressão de genes em células de aleurona, mas também na organogênese da flor, especialmente anteras em desenvolvimento (KANEKO *et al.*, 2004).

Na Figura 11, observa-se que GA₃ endógeno não é suficiente para permitir a expressão de OsGAMYB, entretanto a aplicação da solução exógena de GA₃ e a inoculação com *G. diazotrophicus* foi suficiente em aumentar os fatores de transcrição GA-MYB, o que está de acordo com Tsuchi et al. (2006), que afirma que a expressão miR159 não é regulada por GA₃ endógena em arroz, mas pela GA₃ exógena.

Em células de aleurona, OsGAMYB é um fator essencial para a expressão de genes dependente de GA (TSUCHI *et al.*, 2006). Esses resultados apontam que a maior expressão de GA-MYB induzidos pela inoculação com *G. diazotrophicus* nas sementes de arroz vermelho, resultou em maior produção de enzimas hidrolíticas (fosfatase ácida e α -amilase) conforme Tsuchi et al. (2006), percentual de germinação, índice de velocidade de emergência e primeira contagem de germinação de sementes de arroz vermelho.

A expressão relativa de α -amilase (Os02g0765600) foi aumentada significativamente com incrementos de 56; 85; 85; 84 e 86% para os tratamentos SE H₂O, SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD, respectivamente em relação ao tratamento das sementes não embebidas em água (SNE), e de 67; 66; 64 e 68% para os tratamentos SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD, seguidamente, em relação ao tratamento (SE H₂O), como mostra a Figura 11.

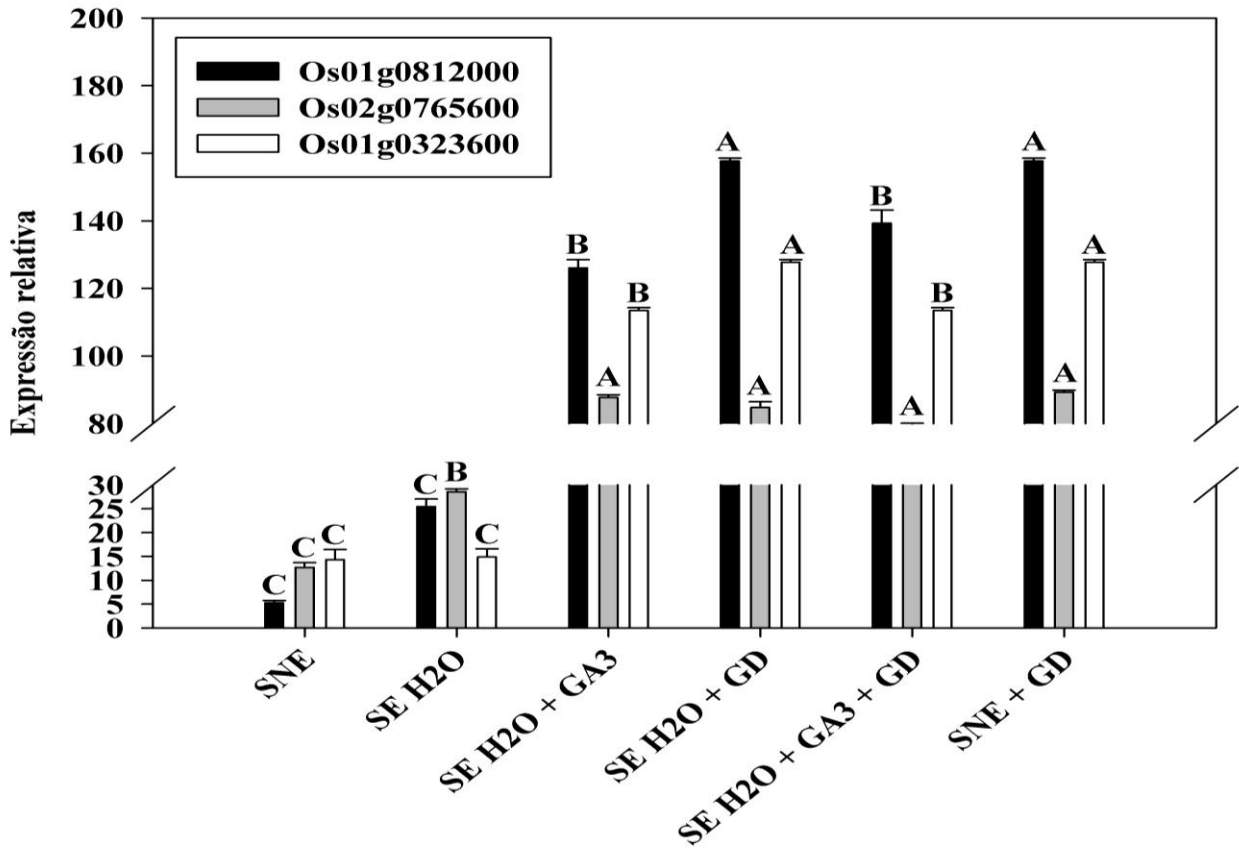


Figura 11. Expressão relativa de fator de transcrição GA-MYB (Os01g0812000), α -amilase (Os02g0765600), S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase (Os01g0323600) de plântulas de arroz vermelho mediante a não embebição e embebição em água, em solução de ácido giberélico e inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* nas sementes. Campina Grande, PB, 2016.

A expressão relativa de α -amilase reflete a expressão de um gene do tipo *RamylA*, ocupando no cromossomo o seguinte locus Os02g0765600 (FUJINO e SEKIGUCHI, 2012). A expressão de genes α -amilase de cereais envolve uma via de transdução de sinal complexa, que controla a transcrição de genes para síntese de α -amilase através da ação de hormônios, como a giberelina, regulando a expressão dos genes α -amilase em aleuronas (ITOHO *et al.*, 1995). As giberelinas foram percebidas nas células de aleurona e induziram a expressão e transcrição de genes α -amilase (Figura 11). Huang *et al.* (2000), estudando a expressão do gene α -amilase *RamylA* em arroz durante a germinação verificaram maior crescimento do coleótilo de arroz em decorrência da maior quantidade de *RamylA* expresso durante a germinação e crescimento inicial. Os resultados deste trabalho corroboram com os destes autores, pois os tratamentos com solução de ácido giberélico e inoculação com *G. diazotrophicus* promoveram maior crescimento radicular e da parte aérea (Figura 6A e B) devido a maior expressão de genes α -amilase, observado na Figura 11. Estes resultados sugerem que a degradação do amido nas sementes e folhas de arroz vermelhas nas fases de

germinação e crescimento inicial pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao aumento da atividade e expressão de α -amilase causada por um aumento no nível de transcrição *Ramy1A*, o que está de acordo com Sugimura et al. (2015) que obtiveram maiores quantidades de *Ramy1A* nas bainhas das folhas de arroz.

Observando-se ainda a Figura 11 verifica-se incrementos de 3; 87; 89; 87 e 89% na expressão relativa de S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase para os tratamentos SE H₂O, SE H₂O + GA₃, SE H₂O + GD, SE H₂O + GA₃ + GD e SNE + GD, respectivamente, comparando-se com o tratamento SNE e de 86% para SE H₂O + GA₃ e SE H₂O + GA₃ + GD e 88% para SE H₂O + GD, SNE + GD, em relação ao tratamento SE H₂O. Constatou-se também, incremento significativo de 11% para os tratamentos SE H₂O + GD e SNE + GD em relação aos tratamentos SE H₂O + GA₃ e SE H₂O + GA₃ + GD, para a expressão relativa de S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase, conforme apresentado na Figura 11.

A S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase é requerida para metilesterificação de pectinas, ácidos nucléicos e componentes da membrana celular, como doador de grupos metil, sendo também um precursor para a síntese etileno e de poliaminas (FONTECAVE *et al.*, 2004). É imprescindível que a expressão e concentração de SAM sejam suficientes para suprir a exigência de grupos metil necessários para as diversas reações de transmetilação. Nesse sentido, qualquer alteração negativa ocorridas na expressão de SAM pode ocasionar em grandes perdas no metabolismo das sementes e plântulas de arroz vermelho, causando uma deficiência no crescimento e desenvolvimento normal da planta (GOOD *et al.*, 1994). A expressão S-adenosil-L-metionina (SAM) sintetase aqui verificada, apontam para a maior necessidade de reações de transmetilações em tecidos em desenvolvimento, nos quais predominam processos metabólicos envolvidos na divisão celular, como a formação de novos componentes da membrana plasmática e parede celular, o que está de acordo com Pereira et al. (2007) que constataram atividade de SAM e seus transcritos em maiores quantidades em órgãos em desenvolvimento do que em órgãos maduros de *Arabidopsis thaliana*. Li et al. (2011), demonstrou que a menor expressão de SAM reprimem a transmetilação do DNA e histonas H3K4me3, levando a floração tardia do arroz. Estes autores verificaram também que a germinação atrasada das sementes de arroz foi resgatada, em grande parte, pela aplicação do SAM. Estes efeitos podem ser atribuídos à capacidade que *G. diazotrophicus* em aumentar os níveis de α -amilase, pois o aumento da expressão dessa proteína durante a germinação resulta numa extraordinária expressão de S-adenosil-metionina sintetase, sendo extremamente necessárias para a germinação de sementes e mudas (HE *et al.*, 2011), promovendo melhorias nos parâmetros da germinação e, posteriormente no crescimento inicial das plântulas de arroz vermelho, conforme anteriormente mostradas na Figura 4, Figura 5, Figura 6 e Figura 7.

6. CONCLUSÕES

A inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em sementes de arroz vermelho aumenta a velocidade de emergência e germinação das plântulas, comprimento radicular, comprimento da parte aérea, atividade da fosfatase ácida e α -amilase, massa fresca total, massa seca total, expressão relativa de α -amilase, fator de transcrição GA-MYB e S-adenosil-metionina sintetase.

G. diazotrophicus inoculada em sementes promove maior atividade bioquímica e molecular em plântulas de arroz vermelho, aos 14 dias após a germinação.

A atividade da fosfatase ácida e α -amilase correlacionam-se positivamente com a percentagem de germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea e radicular.

G. diazotrophicus apresenta grande potencial agrônômico e biotecnológico para aplicação como promotora de crescimento na cultura do arroz vermelho, incrementando a germinação e crescimento inicial de modo independente de embebição das sementes.

7. REFERÊNCIAS

ACHARD, P.; HERR, A.; BAULCOMBE, D.C.; HARBERD, N.P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. **Development**, v.131, n.14, p.3357-3365, 2004.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P.citrophthorae* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.565-568, 2002.

ANVISA. Resolução RE nº 1.390 de 28/03/12. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ad593e004745886d9211d63fbc4c6735/Microsoft+Word+-+A04++%C3%81cido+Giber%C3%A9lico.pdf?MOD=AJPERES>, acessado em novembro de 2015.

ARAÚJO, A.E.S.; ROSSETTO, C.A.V.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência Agrotécnica**, v.34, n.4, p.932-939, 2010.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M.R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v.111, p.249-296, 2011.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, p.206-216, 2007.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, n.2, p.729-770, 1998.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic and gibberelins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.

BELIMOV, A. A.; DODD, I. C.; HONTZEAS, N.; THEOBALD, J. C.; SAFRONOVA, V. I.; DAVIES, W. J. Rhizosphere bacteria containing ACC deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. **New Phytologist**, v.181, n.2, p.413-423, 2009.

BEZERRA, M.C. Eficiência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no aumento de solutos osmoprotetores em arroz vermelho sob deficiência hídrica. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Agroecologia-Universidade Estadual da Paraíba), 33p, 2014.

BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v.92, n.5, p.880-886, 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds. **Physiology of development and germination**. Edit. Plenum Press. 2.ed, 445p, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**, 399p, 2009.

BRITO, A.A.F.; FERREIRA NETO, M.; MIRANDA, N.O.; LEAL, C.C.P.; LIRA, J.F.B. Teores de nutrientes em plantas de arroz vermelho irrigado com água resíduária doméstica. **Irriga**, edição especial 01, p.1-10, 2014.

BUSATO, J.G.; LIMA, L.S.; AGUIAR, N.O.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L. Changes in labilephosphorusformsduringmaturationof vermicomposto enrichedwithphosphorus-solubilizinganddiazotrophic bactéria. **Bioresource Technology**,v.110,p.390-395, 2012.

CASTRO, E.M.; BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P.H.N.; MORAIS, O.P. Arroz.In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Editora da UFV, p.103-140, 2005.

CATO, S.C. Ação de bioestimulante nas culturas do amendoimzeiro, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberelinas. **Tese** (Doutorado em Agronomia-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), 73p, 2006.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J.**Sementes: ciência, tecnologia e produção**.Editora: FUNEP, 4º ed, 588p, 2000.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, n.1, p.23-31, 1988.

CHEN, L.; NISHIZAWA, T.; HIGASHITANI, A.; SUGE, H.; WAKEUI, H.; TAKEDA, K.; TAKAHASHI, HA. A variety of wheat tolerant to deep-seedling conditions: Elongation of the first internode depends on the response to gibberellin and potassium. **Plant, CellandEnvironment**, v.24, p.469-476, 2001.

CHIARELO, C. Efeitos do uso de Stimulate® no desempenho da cultura do arroz irrigado. **Anais** (Congresso de Iniciação Científica da UFPEL), 2007.

CHI, F, SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Appliedand Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7271-7278, 2005

CHING, T.M. **Fisiologia do desenvolvimento da semente**. Pelotas: UFPel, CETREISEM, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, [Curso],1986.

COJHO, E. H.; REIS, V. M.; SCHENBERG, A. C. G.; DOBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 106, n. 3, p. 341-346, 1993.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, safra 2015/16, v.3, n.2, 2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_11_16_15_18_26_safras_nov_2015.pdf, acessado em novembro de 2015.

CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; MARQUES JÚNIOR, R.B.; OLIVARES, F.L. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.4, p.545-548, 2008.

DARTORA, J.; MARINI, D.; GUIMARAES, V.F.; PAULETTI, D.R. SANDER, G. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. **Global Science and Technology**, v.6, n.3, p.190-201, 2013.

DEY, R.; PAL, K.K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v.159, p.371-394, 2004.

DIARRA, A.; SMITH JR., R.J.; TALBERT, R.E. Growth and morphological characteristics of red rice (*Oryza sativa*) biotypes. **Weed Science**, v.33, n.3, p.310-314, 1985.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**, Embrapa-SPI, 60p, 1995.

DORNHOFF, G.M.; SHIBLES, R.M. Varietal differences in net photosynthesis of soybean leaves. **Crop Science**, v.10, p.42-45, 1970.

DOURADO NETO, D.; DARIO, G.J.A.; BARBIERI, A.P.P.; MARTIN, T.N. Ação de bioestimulante no desempenho agrônômico de milho e feijão. **BioscienceJournal**, v. 30, suplemento.1, p. 371-379, 2014.

DUTRA, L.M.F.; BARBOSA, F.M. MELO, A.S.; FERNANDES, P.D.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I.; MENESES, C.H.S.G. inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e seu efeito no desenvolvimento de plantas de arroz vermelho. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.10, n.4, 2014.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatalconductance and photosynthesis. **AnnualReviewofPlantPhysiology**, v. 33, p.317-345, 1982.

FERREIRA, E.P.B.; KNUPP, A.M.; MARTIN-DIDONET, C.C.G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **BioscienseJournal**, v.30, n.3, p.655-665, 2014.

FERREIRA, J.S. Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillumseropedicae* em duas variedades de arroz irrigado. **Tese** (Doutorado em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), 83p, 2008.

FERREIRA, J. S. Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado. **Dissertação** (Mestrado em Ciência do solo-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), 44p, 2004.

FIGUEIREDO, S.L.; RODRIGUES, J.D. Componentes produtivos do trigo afetados pela densidade de semeadura e aplicação de regulador vegetal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n.1, p.39-54, 2014.

FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas**. Passo Fundo: Editora: UPF, 536p, 2004.

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. **Anais** (Congresso brasileiro da cadeia produtiva de arroz e 2ª Reunião nacional de pesquisa de arroz), 2006. Disponível em:

<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/213962/1/CBCTRAB52.pdf>, acessado em novembro de 2015.

FONTECAVE, M.; ATTA, M.; MULLIEZ, E. S-adenosyl-methionine: nothing goes to waste. **Trends Biochemical Sciences**, v.29, p.243-249, 2004.

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v.36, p.397-412, 2002.

FUJINO, K.; SEKIGUCHI, H. **Gene participating in low temperature germinability in rice and utilization of the same.** Hokuren Federatin Of Agricultural Cooperatives, 2012. Disponível em: <https://www.google.com/patents/US8212112>, acesso em Janeiro de 2016.

GEORGIN, J.; LAZZARI, L.; LAMEGO, F.P.; CAMPONOGARA, A. Desenvolvimento inicial de trigo (*Triticumaestivum*) com uso de fitohormônios, zinco e inoculante no tratamento de sementes. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.18, n.4, p.1318-1325, 2014.

GILLIS, K.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; De LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogenfixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.39, 361-364, 1989.

GIRIO, L.A.S.; DIAS, F.L.F.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; SCHULT, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M.A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana - de - açúcar proveniente de mudas pré - brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, n.1, p.33-43, 2015.

GOCAL, G.F.; POOLE, A.T.; GUBLER, F.; WATTS, R.J.; BLUNDELL, C.; KING, R.W. Long-day up-regulation of a *GAMYB* gene during *Lolium temulentum* inflorescence formation. **Plant Physiology**, v.119, p.1271-1281, 1999.

GOOD, X.; KELLOGG, J.A.; WAGNOER, W.; LANGHOFF, D.; MASTSUMURA, W.; BESTWICK, R.K. Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosyl-methionine hydrolase. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.781-790, 1994.

GOVERNO DA PARAÍBA. **Governo inova em sistema de produção para manter ranking de maior plantador de arroz vermelho**, 2015. Disponível em: <http://paraiba.pb.gov.br/governo-inova-em-sistema-de-producao-para-ser-maior-plantador-de-arroz-vermelho/>, acessado em novembro de 2015.

GRAY, E.J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, v.37, p.395-412, 2005.

GROHS, M.; MARCHESAN, E.; ROSO, R.; FORMENTINI, T.C.; OLIVEIRA, M.L. Desempenho de cultivares de arroz com uso de reguladores de crescimento, em diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.6, p.776-783, 2012.

GUBLER, F.; KALLA, R.; ROBERTS, J.K.; JACOBSEN, J.V. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: Evidence for Myb transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter. **The Plant Cell**, v.7, p.1879-1891, 1995.

GUBLER, F.; WATTS, R.J.; KALLA, R.; MATTHEWS, P.; KEYS, M.; JACOBSEN, J.V. Cloning of a rice cDNA encoding a transcription factor homologous to barley GAMYB. **Plant and Cell Physiology**, v.38, p.362-365, 1997.

GUIMARÃES, M.A.; VIDIGAL, D.S.; LOUREIRO, M.E.; DIAS, D.C.F.S.; GUIMARÃES, A.R. Influência de temperatura, luz e giberelina na germinação de sementes de *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl (Brassicaceae). **Revista Ceres**, v. 57, n.3, p. 372-376, 2010.

GUIMARAES, S.L.; BALDANI, V.L.D. Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina. **Revista Ciência Rural**, v.56, n.1, p.125-132, 2013.

GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, v.37, n.2, p.25-30, 2003.

GUSMÃO, A.R.E.; FARIA, J.M.; FONSECA, J.R.; CAMARGO, G.S.O. Variabilidade genética de genótipos de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) introduzidos no banco ativo de germoplasma da EMBRAPA. **Anais** (I Congresso de genética do Centro Oeste), 2008.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.

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

HARPER, J.L. **Population biology of plants**. London: Academic, 892p, 1977.

HE, D.; HAN, C.; YANG, P. Gene expression profile changes in germinating rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.53, n.10, p.835-844, 2011.

HUANG, J.; TOYOFUKU, K.; YAMAGUCHI, J.; AKITA, S. Expression of α -amylase isoforms and the RAmylA gene rice (*Oryza sativa* L.) during seed germination, and its relationship with coleoptile length in submerged soil. **Plant Production Science** v.3, n.1, p.32-37, 2000.

ITOH, K.; YAMAGUCHI, J.; HUANG, N.; RODRIGUEZ, R.L.; AKAZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. Developmental and hormonal regulation of rice α -amylase (*RamyIA*)-*gusA* fusion genes in transgenic rice seeds. **Plant Physiology**, v.107, p.25-31, 1995.

KANEKO, M.; INUKAI, Y.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ITOH, H.; IZAWA, N.K.; KOBAYASHI, Y.; HATTORI, T.; MYAO, A.; HIROCHIKA, H.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. Loss-of-function mutations of the rice GAMYB gene impair α -amylase expression in aleurone and flower development. **The Plant Cell**, v.16, p.33-44, 2004.

LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Organização dos Estados Americanos. **Monografia** (Graduação em Biologia-OEA) 174p, 1983.

LABORIAU, L.G. On the physiology of seed germination in *Vicia graminea* Sm. I. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.42, n.2, p.235-262, 1970.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F.S.; PONS, T.L. **Plant Physiological Ecology**. Editora. Springer-Verlag, 1998. 540p.

LAVAGNINI, C.G.; DI CARNE, C.A.V.; CORREA, F.; HENRIQUE, F.; TOKUMO, L.E.; SILVA, M.H.; SANTOS, P.C.S. Fisiologia vegetal-hormônio giberelina. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia – FAEF**, v.25, n.1, p.48-52, 2014.

LEITE, A.I.; ALMEIDA, M.A.; OLIVEIRA, M.I.; BALÇA, M.J.; COSTA, S.L. Da célula ao organismo. Editora: **Areal Editores**, 120p, 2000.

LI, W.; HAN, .; TAO, F.; CHONG, K. Knockdown of SAMS genes encoding S-adenosyl-l-methionine synthetases causes methylation alterations of DNAs and histones and leads to late flowering in rice. **Journal Plant Physiology**, v.15, p.1837-1843, 2011.

LI, Y.; VAN DEN ENDE, W.; ROLLAND, F. Sucrose induction of anthocyanin biosynthesis is mediated by DELLA. **Molecular Plant**, v.7, p.570-572, 2014.

MAGALHAES, B.Z.N.; VIEIRA, M.C. **Hormônios Vegetais**. Projeto Fundação, Faculdade de Educação da UFRJ, 3p, 2008. Disponível em: http://www.projetofundao.ufrj.br/biologia/images/materiais/hormonios_vegetais_mariana_cabrera_barbara_neil.pdf, acesso em janeiro de 2016.

MAGAZU, S.; MIGLIARDO, F.; BENEDETTO, A.; LA TORRE, R.; HENNET, L. Bio-protective effects of homologous disaccharides on biological macromolecules. **European Biophysics Journal**, v.41, p.361–367, 2012.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Editora. ABRATES- Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 659p, 2015.

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Editora: UFV, 439p, 2011.

MATOS, G.F.; SANTOS, S.G.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; ROUWS, L.F.M. Efeito positivo de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* em germinação e crescimento radicular de cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação. **Anais** (XV Semana Científica JohannaDöbereiner), 2015. Disponível em: <http://ojs.cnpab.embrapa.br/index.php/scjd/article/view/2565/550>, acesso em dezembro de 2015.

MATSUMOTO, K. Giberelinas em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: CID, L.P.B. **Hormônios vegetais em plantas superiores**, 1ª ed. Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia, p.80-101, 2005.

MENDES, R. Arroz, tirando lucro no vermelho. **Revista Rural**, n.146, 2010. Disponível em: <http://www.revistarural.com.br/component/content/article/444-revista-146-abril/1214-arroz-tirando-lucro-no-vermelho>, acessado em novembro de 2015.

MENESES, C. H. S. G. Definição do papel do exopolissacarídeo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 na sobrevivência à estresses abióticos e nas etapas iniciais do processo de colonização de raízes de arroz. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia Vegetal), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 126p, 2010.

MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; SIMOES-ARAÚJO, 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.; LOPES, H. M.; PEREIRA, M. B. Caracterização morfoagronômica em arroz vermelho e arroz de sequeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.41, n.4, p.490-499, 2011.

MISHRA, R.P.; SINGH, R.K.; JAISWAL, H.K.; KUMAR, V.; MAURA, S. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v.52, n.5, p.383-389, 2006.

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**. Editora UFLA, p.449-542, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; JANSSENS, D.; HOSTE, B.; GUM, K. U.; PARK, K. D.; SON, C. Y.; SA, T. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxidans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, n.4, p.277–286, 2005.

NASSIF, S.M.L.; VIEIRA, I.G.; FERNANDES, G.D. Fatores externos (ambientais) que influenciam a germinação de sementes. **Informativo Sementes-IPEF**, 1998. Disponível em <http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>, acessado em novembro de 2015.

OLIVEIRA, N.C. Seleção de microrganismos endofíticos com potencialidades para a biorremediação de ambientes contaminados. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia- Universidade Federal de Goiás), 80p, 2010.

OSORIO FILHO, B.D.; BINZ, A.; LIMA, R.F.; GIONGO, A.; SÁ, E.L.S. Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, v.46, n.3, p.478-485, 2016.

PEREIRA, J.A.; MORAIS, O.P.; BRESEGHELLO, F. Análise da heterose de cruzamentos entre variedades de arroz-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p.1135-1142, 2008.

PEREIRA, L.A.; TODOROVA, M.; CAI, X.; MAKAROFF, C.A.; EMERY, R.J.; MOFFATT, B.A. Methylrecycling activities are co-ordinately regulated during plant development. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.1083-1098, 2007.

RAMESH, A.; SHARMA, S.K. YADAV, N.; JOSHI, O.P. Phosphorus mobilization from native soil P-pool upon inoculation with phytate-mineralizing and phosphate-solubilizing *Bacillus aryabhatai* isolates for improve P-acquisition and growth of soybean and wheat crops in microcos conditions. **Agricultural Research**, v.3, n.2, p.118-127, 2014.

REIS, V. M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **CriticalReviews in PlantSciences**, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, D.F.A.; COSTA, E.M.M.; GONÇALVES, J.R.; CIDES, M.F.B.; RODRIGUES, T.M. A influência da luz na germinação das sementes de rabanete (*Raphanussativus*, L.). **AdolesCiência - Revista Júnior de Investigação**, v.3, n.1, 2014.

RIBEIRO, E.B.; SILVEIRA, E.K.C.P.; MELO, E.F.; FARIA, R.A.N.; LONDE, L.N. ALBUQUERQUE, C.J.B. Germinação de diferentes linhagens de sorgo em resposta ao fotoblastismo. **Anais** (XXIX Congresso Nacional de milho e sorgo), 2012.

RODRIGUES, L.A.;BATISTA, M.S.;ALVAREZ, R.C.F.; LIMA, S.F.; ALVES, C.Z. Avaliação fisiológica de sementes de arroz submetidas a doses de bioestimulante. **Nucleus**, v.12, n.1, 2015.

RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.E.L.; MEDEIROS, V.V.; BARROS, B.G.F.; FIGUEIREDO, M.V.B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. emcaupi. **BioscienceJournal**, v.28, Supplement1, p.196-202, 2012.

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

ROUWS, L.F.M.; MENESES, C.H.S.G.; GUEDES, H.V.; VIDAL, M.S.; BALDANI J. I.; SCHWAB, S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophyticdiazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gus A reporter genes. **Letters in AppliedMicrobiology**, v.51, n.3, p.325-330, 2010.

SANTOS, V.M.; MELO, A.V.; CARDOSO, D.P.; GONCALVES, A.H.; VARANDA, M.A.F.; TAUBINGER, M. Uso de bioestimulante no crescimento de plantas de *Zeamays*L. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.3, p.307-318, 2013.

SANTOS, J.V.A.; SCHAEGLER, C.E.; SILVA, V.N.; SCALCON, R.M.; SILVEIRA, P.C. Uso de fitorregulador no tratamento de sementes de cultivares de arroz irrigado (*Oryza sativa*) e biótipo de arroz vermelho. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v.6, n.2, 2014.

SARATHAMBAL, C.; THANGARAJU, M.; PAULRAJ, C; GOMATHY, M. Assessing the Zinc solubilization ability of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in maize rhizosphere using labelled ⁶⁵Zn compounds. **Indian Journal of Microbiology**, v.50, p.1003-109, 2010.

SCHADCHINA, T.M.; DMITRIEVA, V.V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. **Journal of Plant Nutrition**, v.18, p.1427-1437, 1995.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; NAIANA CRISTINE GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.658-664, 2008.

SILVA, I.F. Produção de amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando torta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*) como substratos. **Dissertação** (Mestrado em Química- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri), 75p, 2012.

SILVEIRA, E. L. Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. **Tese** (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista), 83p. 2008.

SOARES, E.A.C.; ARAUJO, J.M.; GOMES, E.A.; SILVA, P.G. MATTOS, B.B.; ALVES. V.M.C.; MARRIEL. I.E.; OLIVEIRA, C.A. Alterações na atividade das enzimas fosfatases ácidas e alcalinas, em solo cultivado com milho adubado com fosfatos e inoculado com

microrganismos solubilizadores. **Anais** (XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo), p.1770-1777, 2012.

SOARES, V.N.; RADKE, A.K.; TILLMANN, M.A.A.; MOURA, A.B.; SCHUCH, L.O.B. Desempenho fisiológico de sementes de arroz tratadas com rizobactérias e tiametoxam submetidas a diferentes temperaturas. **Journal of Seed Science**, v.36, n.2, p.186-193, 2014.

SOARES, V.N.; TILLMANN, M.A.A.; MOURA, A.B.; ZANATTA, Z.G.C.N. Potencial fisiológico de sementes de arroz tratadas com rizobactérias ou tiametoxam. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 34, nº 4 p. 563-572, 2012.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, p.205-240, 2004.

SPENCER, J.; RAGOUT, A. **Métodos microbiológicos**. Editora: Humana Press, 335p, 2001.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DOBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.77, n.1, p. 67-72, 1991.

SUGIMURA, Y.; MICHİYAMA, H.; HIRANO, T. Involvement of α -amylase genes in starch degradation in rice leaf sheaths at the post-reading stage. **Plant Production Science**, v.18, n.3, p.277-283, 2015.

SYSTAT SOFTWARE INC. **SigmaPlot**. San Jose California USA, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ª ed. Porto Alegre: Editora: Artmed, 819p, 2009.

TEJERA, N. A.; ORTEGA, E.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; LLUCH, C. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.3, p.528-535, 2003.

TSUJI, H.; AYA, K.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SHIMADA, Y.; NAKAZONO, M.; WATANABE, R.; IZAWA, N.K.; GOMI, K.; SHIMADA, A.; KITANO, H.; ASHIKARI,

M.;MATSUOKA, M. GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. **The Plant Journal**, v.47, p.427-444, 2006.

USDA.United States Department of Agriculture. **Production, supply and distribution online: custom query**.2009. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>, acessado em: novembro de 2015.

SZILAGYI-ZECCHIN, V.J.; MOGOR, A.F.; RUARO, L.; RODER, C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanumlycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillusamyloliquefaciens*subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, p.26-33, 2015.

WAGNER JUNIOR, A.; ALEXANDRE, R.S.; NEGREIROS, J.R.S.; PARIZZOTTO, A.; BRUCKNER, C.H. Influencia da escarificação e do tempo de embebição das sementes sobre a germinação de maracujazeiro (*Passiflora eduliseFlavicarpadegener*). **Revista Ceres**, v.52, n.301, p.369-378, 2005.

WEATHERLEY, P.E. Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficit in leaves. **New Phytologist**, v.49, p.81-97, 1950.

WEBER, J.M. Arroz: características químicas, culinárias e nutricionais das diferentes variedades consumidas no Brasil. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Nutrição-Universidade de Brasília), 71p, 2012.

YUWONO, T.; HANDAYANI, D.; SOEDARSONO, J.The role of osmotoleranthrizoacteria in rice growth under different drought conditions.**AustralianJournalofAgriculturalResearch**, n.56, p.715-721, 2005.