

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE *LOTUS* *CORNICULATUS* L. E *AVENA STRIGOSA* SCHREB PELA INOCULAÇÃO CONJUNTA DE *TRICHODERMA HARZIANUM* E RIZÓBIO

Rafael Goulart Machado, Enilson Luiz Saccol de Sá, Raquel Garibaldi Damasceno, Leandro Hahn, Denice Almeida, Tatiana Moraes, Flávio Anastácio de Oliveira Camargo, Diego Sevastian Reartes

Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS
e-mail: rgoulartmachado@gmail.com

Resumo

Existem evidências de que espécies de *Trichoderma* podem favorecer a nodulação de leguminosas por rizóbios. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a promoção de crescimento em plantas de *Lotus corniculatus* L. (cornichão) e *Avena strigosa* Schreb (aveia preta), pela inoculação com isolados de rizóbio e *Trichoderma harzianum* em experimento realizado em vasos com mistura esterilizada de areia e vermiculita, em casa de vegetação. Testou-se a inoculação de cinco cepas de rizóbio (UFRGS Lc322; UFRGS Lc434; UFRGS Lc524; SEMIA816 e U510) em sementes pré-germinadas de aveia preta e cornichão, tanto isoladamente quanto em conjunto com o fungo *T. harzianum*. Os tratamentos inoculados foram comparados a controles, com diferentes níveis de adubação nitrogenada: 0 e 80 Kg N ha⁻¹ para o cornichão; 40 e 80 Kg N ha⁻¹ para a aveia preta. A inoculação com os rizóbios, isoladamente e em mistura com *T. harzianum*, aumentou o nitrogênio mineral absorvido e a massa vegetal da parte aérea das plantas de aveia preta, em comparação ao trata-

mento controle sem inoculação (Controle + N/2). Com exceção do tratamento UFRGS Lc434 + *T. harzianum*, não houve diferenças quanto ao teor de N da parte aérea entre os demais tratamentos inoculados e o tratamento controle sem inoculação que recebeu o dobro de nitrogênio (Controle + N). Nos testes com *L. corniculatus*, o efeito estimulatório do *T. harzianum* em inoculação conjunta com rizóbios, sobre o crescimento e nodulação de plantas, depende da interação com os rizóbios inoculados conjuntamente. A produção de massa seca e o teor de nitrogênio total acumulado na parte aérea do tratamento Controle + N não diferiram das plantas dos tratamentos inoculados com os rizóbios SEMIA816 e UFRGS Lc524, e dos tratamentos inoculados com os rizóbios em conjunto com o *T. harzianum* (U510 + *T. harzianum*, SEMIA816 + *T. harzianum*, UFRGS Lc322 + *T. harzianum*, e UFRGS Lc524 + *T. harzianum*), o que evidencia efeito estimulatório ao crescimento da leguminosa por estes microorganismos.

Palavras-chave: promotores de crescimento vegetal, fixação biológica de nitrogênio, ácido indol-acético (AIA).

Abstract

There is evidence that species of *Trichoderma* can promote nodulation of legumes by rhizobia. This study aims to evaluate the promotion of growth in plants *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil) and *Avena strigosa* Schreb (black oat), by inoculation with rhizobia and *Trichoderma harzianum* in an experiment conducted in vases containing sterilized mixture of sand and vermiculite which were stored in a greenhouse. The inoculation of five nitrogen fixing bacteria was tested (UFRGS Lc322; UFRGS Lc434; UFRGS Lc524; SEMIA816 and U510) using pre-germinated seeds of black oat and birdsfoot trefoil. The bacteria were tested individually and in combination with *T. harzianum* fungi. The treatments were compared using control samples, which contained different levels of nitrogen: 0 and 80 Kg N ha⁻¹ for birdsfoot trefoils samples; 40 and 80 Kg N ha⁻¹ for black oat samples.

In rhizobia inoculations, either individually or in combination with *T. harzianum*, there was an increase in nitrogen absorption and in the aerial biomass of black oat when compared to uninoculated control samples

(Control +N/2). Excepted the treatment UFRGS Lc434 +*T. harzianum*, there was no differences in N levels accumulated in the aerial fraction, among other treatments inoculated and uninoculated control treatment with twice nitrogen (Control +N). In experiments with *L. corniculatus*, the stimulatory effect of *T. harzianum* in joint inoculation with rhizobia on growth and nodulation of plants, depends of the interaction with rhizobia inoculated together. The production of dry matter and nitrogen levels accumulated in the aerial fraction of Control +N did not differ from samples inoculated with rhizobia SEMIA816 and UFRGS Lc524, as well as in samples inoculated with combinations of rhizobia and *T. harzianum* (U510 +*T. harzianum*, SEMIA816 +*T. harzianum*, UFRGS Lc322 +*T. harzianum*, and UFRGS Lc524 +*T. harzianum*), which shows stimulatory effect growth of the leguminous plant by these microorganisms.

Key words: plant growth-promoters, biological nitrogen fixation, indole-3-acid acetic (IAA).

Introdução

Bactérias promotoras de crescimento, conhecidas na literatura como “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR) ou “rhizobacteria promotora de crescimento de plantas” (RPCP), colonizam diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre elas, podendo promover aumentos na taxa de germinação de sementes, no desenvolvimento de órgãos, na produção de flores e no rendimento das culturas em casa de vegetação e no campo (Dey et al., 2004).

Diversos são os mecanismos de promoção de crescimento de plantas por microorganismos do solo, podendo ser diretos como a produção de hormônios, ou outras substâncias análogas a estes, os quais influenciam diretamente no crescimento ou desenvolvimento da planta (Bashan e Holguin, 1997), ou ainda suprindo as suas necessidades nutricionais, por mecanismos como a fixação biológica do nitrogênio (Taiz e Zieger, 2004) e solubilização de fosfatos (Bloemberg e Lugtenberg, 2001). Os benefícios indiretos da inoculação de microrganismos em sementes ou plântulas podem ser por meio da supressão de patógenos (Harman et al., 2004).

Os rizóbios são mais conhecidos pela fixação biológica do nitrogênio em simbiose com leguminosas, processo que reduz significativamente

os custos com adubação nitrogenada no cultivo destas plantas. Porém, nos últimos anos, pesquisadores têm constatado que, além de serem eficientes fixadores de nitrogênio, os rizóbios também são capazes de promover o crescimento de não-leguminosas por meio de outros mecanismos, entre estes a produção de hormônios (Yanii et al., 2001; Chen et al., 2005; Schindwein et al., 2008).

A síntese de auxinas, particularmente o ácido indol-acético (AIA), promove o crescimento das raízes e a proliferação de pêlos radiculares, melhorando a absorção de água e nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento da planta (Caballero-Mellado et al., 2006).

Trabalhos conduzidos com *Oryza sativa* (arroz) e *Trifolium alexandrinum* (trevo alexandrino) relatam a produção de giberelina (Bloemberg e Lugtenberg, 2001; Yanii et al., 2001). Bloemberg e Lugtenberg (2001) e Persello-Cartieaux et al. (2003) relatam a produção de citocininas por rizóbios associados à canola (*Brassica napus*). Hormônios do grupo das giberelinas e citocininas estão relacionados com o alongamento celular e, com isso, têm efeitos fisiológicos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (Metivier, 1986).

A mineralização de fósforo orgânico ou a liberação de ácidos orgânicos para a solubilização de fosfato inorgânico (Bloemberg e Lugtenberg, 2001) bem como a produção de sideróforos quelantes de ferro (Rodríguez e Fraga, 1999) são outros mecanismos bioquímicos que também podem ser utilizados pelos rizóbios para favorecer o crescimento de gramíneas.

Outros microrganismos como *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Bacillus* e *Pseudomonas* também são associados à promoção de crescimento de plantas (Corrêa, 2009). Estirpes de *Trichoderma* são agentes de controle biológico, agindo contra fungos fitopatogênicos, mas podem colonizar raízes de plantas para estimular o crescimento e proteção contra infecções. A colonização da raiz frequentemente aumenta o desenvolvimento radicular, produtividade da cultura, resistência a estresses abióticos e melhora o uso de nutrientes (Benítez et al., 2004).

Existem evidências da indução de resistência localizada e sistêmica por espécies de *Trichoderma* em diversas plantas para uma variedade de patógenos, além de sua influência considerável sobre o desenvolvimento das plantas (Harman et al., 2000). Além disso, *Trichoderma* são ativos na produção de parede celular fúngica, enzimas de degradação, incluindo pectinases, celulases e quitinases que estão envolvidas no processo de

controle biológico (Barbosa et al., 2001).

Segundo Sindhu e Dadarwal (2001), a dupla inoculação de sementes de leguminosas com microrganismos quitinolíticos e celulolíticos e com *Rhizobium* não só protege as plantas contra várias doenças, mas também é necessária para melhorar o crescimento e nodulação.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a inoculação de cepas e estirpes de rizóbio em conjunto com produto comercial à base de *Trichoderma harzianum* na promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. (cornichão) e *Avena strigosa* Schreb (aveia preta).

Material e métodos

Foram estudadas duas plantas: a leguminosa forrageira da espécie *Lotus corniculatus* L. (cornichão), cultivar São Gabriel, e a gramínea *Avena strigosa* Schreb (aveia preta), cultivar Agro Zebú. Para isso, dois experimentos foram conduzidos simultaneamente, durante 60 dias, na casa de vegetação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Foram utilizadas as cepas de rizóbios para *Lotus corniculatus*, UFRGS Lc322, UFRGS Lc434 e UFRGS Lc524, obtidas da Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS, a estirpe SEMIA816, liberada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para produção de inoculantes para *L. corniculatus*, proveniente da Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO), e a estirpe U510, cedida pelo pesquisador Carlos Labandera do Ministerio de Ganaderia, Agricultura y Pesca do Uruguai, recomendada para *L. corniculatus* no Uruguai. Também se utilizou o inoculante comercial à base de material orgânico inerte e conídios do fungo *Trichoderma harzianum*, da Cepa 1306 (Görge et al., 2009).

Os experimentos consistiram de 11 tratamentos inoculados e dois tratamentos controle não inoculados, com cinco repetições, os quais foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado. Cinco desses tratamentos foram inoculados com as cepas de rizóbios UFRGS Lc322, UFRGS Lc434, UFRGS Lc524 e as estirpes SEMIA816 e U510. Cinco tratamentos foram compostos pelas co-inoculações UFRGS Lc322 +*T. harzianum*, UFRGS Lc434 +*T. harzianum*, UFRGS Lc524 +*T.*

harzianum, SEMIA816 + *T. harzianum* e U510 + *T. harzianum*, e um tratamento foi inoculado apenas com o fungo *T. harzianum*. Os dois tratamentos controle, em ambos os experimentos, foram conduzidos sem inoculação e consistiram de diferentes níveis de adubação nitrogenada mineral, com solução de nitrato de amônio (NH_4NO_3), com concentração de 2,86 g L⁻¹.

No experimento com o cornichão, os tratamentos controle serviram como parâmetros comparativos para se avaliar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e outros mecanismos de promoção de crescimento de plantas, foram conduzidos dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um sem adição de N (Controle -N) e outro com adição de dose equivalente a 80 kg de N ha⁻¹. Devido à fixação biológica de N decorrente da associação rizóbio-leguminosa, no experimento com o cornichão, nenhum dos tratamentos inoculados recebeu adição de N.

No experimento com a aveia preta, devido ao fato de a gramínea não fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico, mesmo quando inoculada com rizóbios, para se evitar que as plantas morressem durante o experimento por falta deste nutriente essencial, visto que o substrato utilizado foi composto por partículas inertes, aplicou-se a todos os tratamentos inoculados uma dose de N equivalente a 40 kg ha⁻¹, metade da recomendação de adubação nitrogenada mineral para rendimento de 3 t ha⁻¹, para a cultura da aveia preta (CQFS-RS/SC, 2004). Como parâmetros comparativos, foram conduzidos os tratamentos controle não inoculados, os quais receberam doses de N equivalentes a 40 kg de N ha⁻¹ (Controle -N) e 80 kg de N ha⁻¹ (Controle +N).

Para quebra da dormência, as sementes de cornichão foram submetidas a tratamento térmico por imersão em água destilada a 80 °C por 30 segundos. Posteriormente, as sementes de cornichão e de aveia preta foram desinfestadas por imersões sucessivas em álcool (70%) por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens consecutivas com água destilada e esterilizada. Em seguida, para pré-germinação, as sementes de ambas as espécies foram colocadas em rolos de papel toalha esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada, e mantidas em estufa a 28°C por 48 horas. Em vasos de Leonard (Vincent, 1970), foram colocadas nove sementes pré-germinadas de cornichão por vaso. Uma semana após a emergência das mudas, efetuou-se o desbaste, deixando-se três plantas por vaso. Previamente à

semeadura, os vasos foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 atm por 90 minutos. Os vasos continham, na parte superior, uma mistura de vermiculita e areia, na proporção 2:1 e, na parte inferior, solução nutritiva (Sarruge, 1975), previamente esterilizada, isenta de nitrogênio e com pH 6. A solução nutritiva foi repostada uma vez por semana durante o experimento.

A aveia preta foi semeada em vasos plásticos de dois litros, previamente flambados com álcool etílico 99%. Em seguida, adicionou-se a mistura de vermiculita e areia (2:1), previamente esterilizada em autoclave a 120 °C e 1 atm durante 90 minutos. Em cada vaso, foram colocadas seis sementes pré-germinadas de aveia preta. Quinze dias após a emergência, efetuou-se o desbaste, deixando-se três plantas por vaso. Em cada vaso, foram adicionados semanalmente 250 mL da solução nutritiva (Sarruge, 1975), isenta de N.

Para a produção do inóculo, os rizóbios foram inoculados em tubos com meio Levedura-Manitol (LM) a pH 6,8 (Vincent, 1970) e incubados a 28°C por 15 dias. Posteriormente, as culturas foram inoculadas em erlenmeyers de 250 mL com 80 mL de meio de cultura LM líquido (Vincent, 1970) e colocadas em incubador orbital a 28 °C, com agitação de 120 rpm por seis dias. No dia seguinte à semeadura, foram inoculados dois mL do caldo das culturas de rizóbios por vaso, com cerca de 10^8 unidades formadoras de colônia (ufc) mL⁻¹. Nos tratamentos que receberam o *T. harzianum*, aplicou-se inoculante comercial com 2×10^9 conídios viáveis por mL do produto. Em ambos os experimentos, as aplicações do *T. harzianum* foram efetuadas de acordo com a recomendação do fabricante, sendo equivalentes a 1000 mL ha⁻¹.

Sessenta dias após a semeadura, os experimentos foram encerrados e quantificaram-se parâmetros de crescimento de plantas, nodulação (no caso do cornichão) e acúmulo de N na parte aérea das plantas de cornichão e aveia preta. Em ambos os experimentos, as plantas foram coletadas, separando-se a parte aérea das raízes. No experimento com aveia preta, as raízes foram lavadas e, logo após, mediu-se o volume radicular, mergulhando-se as raízes em proveta de 500 mL com volume conhecido de água destilada. No experimento com cornichão, após a coleta das plantas, as raízes também foram lavadas e os nódulos foram destacados das raízes, quantificados e pesados após secagem a 65°C até peso constante. Após esses procedimentos, ambas as plantas foram secas à temperatura

de 65°C até peso constante, para posterior quantificação da massa seca da parte aérea e radicular. Também foi quantificado o teor de nitrogênio total na parte aérea de ambas as plantas (Tedesco et al., 1995). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de médias (Scott Knott, 5%), utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

Resultados e discussão

Promoção de crescimento em plantas de aveia preta

A produção de massa seca da parte aérea das plantas de aveia preta de todos os tratamentos inoculados foi superior ao Controle +N/2 (Tabela 1). Com isso, demonstra-se que há efeito estimulatório de todos os organismos testados sobre as plantas de aveia preta, seja inoculados conjunta ou isoladamente. Todas as cepas e estirpes de rizóbios testadas, bem como o *T. harzianum*, foram capazes de promover o crescimento das plantas de aveia preta, aumentando a massa vegetal da parte aérea (Tabela 1).

Estes resultados mostram que a inoculação com os rizóbios e com *T. harzianum*, tanto isoladamente como em mistura, promoveram o aumento da massa vegetal da parte aérea das plantas. Já as plantas dos tratamentos inoculados isoladamente com a estirpe SEMIA816 e com as cepas UFRGS Lc322, UFRGS Lc434, UFRGS Lc524, bem como as inoculações conjuntas de rizóbios e *Trichoderma* U510 + *T. harzianum*, SEMIA816 + *T. harzianum*, UFRGS Lc322 + *T. harzianum*, UFRGS Lc434 + *T. harzianum*, produziram maior massa seca da parte aérea do que as plantas do tratamento controle sem inoculação e que recebeu o dobro de nitrogênio (Controle +N) (Tabela 1). Em trabalho conduzido por Yanni et al. (2001), também houve efeito positivo de rizóbios em diferentes variedades de arroz. Entre outros benefícios, foi relatada maior produção de biomassa vegetativa nas plantas inoculadas, a qual provavelmente está relacionada à modulação da arquitetura radicular das plantas pelos rizóbios e melhor exploração da rizosfera.

Observou-se que a inoculação conjunta de *T. harzianum* com a estirpe SEMIA816, bem como com a cepa UFRGS Lc524, promoveu menor aumento de massa seca da parte aérea e volume radicular das plantas, comparativamente aos respectivos tratamentos sem o fungo *T. harzianum*.

Efeito similar foi observado no tratamento inoculado com *T. harzianum* em conjunto com a cepa UFRGS Lc434, no qual comparativamente ao tratamento UFRGS Lc434 obteve-se menor massa seca da parte aérea (32%), N total (26%) e número de perfilhos das plantas (32%). Salienta-se que durante o experimento não se verificou ação de organismos patogênicos nas plantas, condição em que os mecanismos de supressão a patógenos do *T. harzianum* não foram expressos. Com isso, o efeito estimulatório nos tratamentos inoculados com *T. harzianum* deve-se apenas a mecanismos diretos de promoção de crescimento de plantas, possivelmente à produção de fitohormônios.

Tabela 1. Massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio total (N-Total) acumulado na parte aérea, massa seca da raiz (MSR), volume da raiz (VR) e número de perfilhos (NP) de plantas de Aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) inoculadas com rizóbio e misturas de rizóbio e *T. harzianum*, avaliados 60 dias após a germinação.

Tratamentos	MSPA	MSR	N-Total	VR	NP
 mg planta ⁻¹	 cm ³		
Controle+N	2100* b	990 a	24,8 a	15,2 a	10,8 a
<i>T. harzianum</i>	1970 b	640 a	24,7 a	14,4 a	8,8 b
U510	1860 b	840 a	21,4 a	9,8 b	8,0 b
U510 + <i>T. harzianum</i>	2480 a	860 a	29,3 a	12,6 a	10,6 a
SEMIA816	2370 a	990 a	25,5 a	14,4 a	12,0 a
SEMIA816 + <i>T. harzianum</i>	1920 b	760 a	24,8 a	11,6 b	9,4 a
UFRGS Lc322	2160 a	850 a	23,7 a	12,4 a	9,6 a
UFRGS Lc322 + <i>T. harzianum</i>	2400 a	860 a	29,9 a	14,4 a	10,8 a
UFRGS Lc434	2420 a	790 a	25,7 a	13,0 a	11,4 a
UFRGS Lc434 + <i>T. harzianum</i>	1650 b	680 a	19,0 b	15,0 a	7,8 b
UFRGS Lc524	2270 a	800 a	24,9 a	14,8 a	10,0 a
UFRGS Lc524 + <i>T. harzianum</i>	1870 b	700 a	24,9 a	10,8 b	10,0 a
Controle+N/2	1220 c	490 a	12,5 b	8,6 b	7,6 b
CV (%)	17200	36000	23,5	22,5	12,2

Médias de cinco repetições. *Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade.

Nos tratamentos inoculados com a estirpe U510, as plantas do tratamento com inoculação conjunta apresentaram maior massa seca da parte aérea (33%), volume radicular (29%) e número de perfilhos das plantas (33%), comparativamente à inoculação da estirpe U510 isoladamente. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Saber et al. (2009), em que a co-inoculação de *T. harzianum* e rizóbios estimulou a ação das bactérias e facilitou a infecção dos pelos radiculares e o enrolamento do pelo radicular, devido à produção de quitinase e celulase por parte do fungo.

Observou-se que, apesar de não serem capazes de fixar biologicamente nitrogênio atmosférico em gramíneas, os rizóbios podem promover significativos incrementos no crescimento vegetal através de outros mecanismos, possivelmente por meio da produção de fitohormônios. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos. Com a inoculação de sementes de alface com isolados de *Bradyrhizobium* sp., que produziam o hormônio ácido indol-acético (AIA) em baixas concentrações (1,2 a 3,3 μ g mL⁻¹) quando crescidos em meio de cultura enriquecido com triptofano, Schlindwein et al. (2008) verificaram a elevação dos parâmetros de germinação e de crescimento das plântulas de alface em relação ao tratamento sem inoculação.

Trabalhando com a cultivar de arroz IRGA424, Osório Filho (2009) verificou que esta foi bastante responsiva à inoculação com rizóbios. Quando inoculada a esta cultivar, a cepa de rizóbio UFRGS Lc348 promoveu crescimento da parte aérea, apresentando uma eficiência relativa superior a 88%. Segundo Osório Filho (2009), com este estudo foi possível observar que há especificidade entre cultivares de arroz e rizóbios, e que alguns materiais genéticos são mais responsivos. Outro exemplo de compatibilidade rizóbio/gramínea é o comportamento da cepa UFRGS Lc394 do gênero *Bradyrhizobium*, única cepa entre as oito avaliadas por Machado (2011) que não promoveu crescimento vegetal em capim Tanzânia (*Panicum maximum*). Esta mesma cepa incrementou a massa seca da parte aérea, massa seca radicular e volume radicular de pensacola (*Paspalum sauriae* (Parodi) Parodi), sendo um excelente promotor de crescimento para esta espécie (Machado, 2011).

Houve maior acúmulo de nitrogênio total na parte aérea das plantas de aveia preta dos tratamentos inoculados, em comparação ao tratamento controle sem inoculação (Controle +N/2), não havendo diferenças entre os tratamentos inoculados e o tratamento controle sem inoculação que

recebeu o dobro de nitrogênio (Controle +N) (Tabela 1). A exceção foi o tratamento UFRGS Lc434 + *T. harzianum*, o qual não diferiu do Controle +N/2 (Tabela 1). Esses resultados mostram que, isoladamente ou quando inoculados em conjunto, os rizóbios e o fungo induzem efeito estimulatório na absorção de nitrogênio pela planta, embora não tenha sido verificado aumento no sistema radicular (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos no estudo da interação entre *T. harzianum* (cepa T-22) e doses de fertilizante nitrogenado sobre o crescimento e o rendimento de milho (Harman, 2000), em que se verificou que com a inoculação o máximo rendimento foi obtido com 38% menos nitrogênio.

Promoção de crescimento em plantas de Cornichão

A produção de massa seca e o teor de nitrogênio total acumulado na parte aérea do tratamento Controle +N não diferiram das plantas dos tratamentos inoculados isoladamente com a estirpe SEMIA816 e a cepa UFRGS Lc524 e também dos tratamentos inoculados com os rizóbios em conjunto com o *T. harzianum* (U510 + *T. harzianum*, SEMIA816 + *T. harzianum*, UFRGS Lc322 + *T. harzianum*, e UFRGS Lc524 + *T. harzianum*), o que evidencia que os rizóbios inoculados foram eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico em simbiose com plantas de *L. corniculatus* (Tabela 2).

Os resultados relativos à produção de massa seca da parte aérea, nos tratamentos inoculados com a estirpe SEMIA816 e a cepa UFRGS Lc524 foram superiores aos obtidos em outros trabalhos com inoculação de rizóbios em *L. corniculatus* por Scheffer-Basso (2001) em 447 e 381% e por Frizzo (2007) em 149 e 127%, respectivamente. Já o maior teor de N total da parte aérea obtido no presente experimento (7,3 mg por planta, na inoculação com a estirpe SEMIA816) foi 40% inferior ao acúmulo de N observado por Frizzo (2007) com inoculação de rizóbio em *L. corniculatus*.

O isolado UFRGS Lc434, inoculado isoladamente ou em conjunto com o *T. harzianum* foi simbioticamente ineficiente, pois a produção de massa seca da parte aérea e o nitrogênio total acumulado nas plantas não diferiram do tratamento controle sem inoculação e sem adição de nitrogênio (Tabela 2).

Tabela 2. Massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio total acumulado (N-Total), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de plantas de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) inoculadas com rizóbio e misturas destes com *T. harzianum*, avaliadas 60 dias após germinação.

Tratamentos	MSPA	N Total	MSN	NN
 mg planta ⁻¹ mg planta ⁻¹ mg planta ⁻¹	n° planta ⁻¹
Controle+N	466 a	3,9 a	-	-
<i>T. harzianum</i>	258 b	1,5 b	-	-
U510	348 b	4,7 a	5 b	49 b
U510 + <i>T. harzianum</i>	532 a	5,6 a	11 a	73 b
SEMIA816	586 a	7,3 a	13 a	81 a
SEMIA816 + <i>T. harzianum</i>	430 a	4,9 a	10 a	60 b
UFRGS Lc322	228 b	2,5 b	3 b	10 d
UFRGS Lc322 + <i>T. harzianum</i>	580 a	5,6 a	13 a	65 b
UFRGS Lc434	218 b	2,0 b	3 b	8 d
UFRGS Lc434 + <i>T. harzianum</i>	182 b	1,8 b	5 b	38 c
UFRGS Lc524	500 a	6,3 a	13 a	89 a
UFRGS Lc524 + <i>T. harzianum</i>	514 a	5,5 a	13 a	93 a
Controle-N	100 b	0,7 b	-	-
CV (%)	30,7	43,8	37,6	37,7

Médias de cinco repetições. *Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

As maiores massas de nódulos foram observadas nas plantas dos tratamentos inoculados com as estirpes SEMIA816 (13 mg), com a cepa UFRGS Lc524 (13 mg) e com o tratamento conjugado de rizóbios e *Trichoderma*, UFRGS Lc524 + *T. harzianum* (13 mg), SEMIA816 + *T. harzianum* (10 mg), UFRGS Lc322 + *T. harzianum* (13 mg) e U510 + *T. harzianum* (11 mg). A nodulação desses tratamentos variou de 60 a 93 nódulos por planta, sendo bastante efetiva, se comparada aos valores observados nos trabalhos de Scheffer-Basso et al. (2001) e Barrientos et al. (2002), os quais obtiveram médias de 19 e 1 nódulo por planta respectivamente, em trabalhos onde também inoculou-se rizóbios em *L. corniculatus* e obteve-se baixa infectividade e insuficiente efetividade de fixação de N.

Os resultados indicam que a inoculação conjunta de *Trichoderma* com

a estirpe U510 e o isolado UFRGS Lc322 produziu maior massa seca de nódulos (220 e 433%, respectivamente) e massa seca da parte aérea (153 e 254%, respectivamente) nas plantas inoculadas em comparação aos resultados obtidos nas plantas inoculadas somente com os isolados de rizóbio (Tabela 2). Estes resultados mostram que a inoculação com *Trichoderma* apresentou efeito estimulatório. De acordo com Saber et al. (2009), enzimas produzidas por fungos do gênero *Trichoderma*, como a quitinase e a celulase, podem contribuir na nodulação de leguminosas por rizóbios. No entanto, não foi observado efeito estimulatório quando inoculado em conjunto com o isolado UFRGS Lc434 e com a estirpe recomendada SEMIA 816 (Tabela 2). Os resultados evidenciam que o efeito estimulatório da inoculação conjunta de *Trichoderma* com rizóbios parece depender da interação entre os componentes da mistura (Tabela 2).

Conclusão

A inoculação com as cepas UFRGS Lc322, UFRGS Lc434 e UFRGS Lc524 e com as estirpes U510 e SEMIA816, tanto isoladamente quanto em conjunto com *Trichoderma harzianum*, promove o aumento do nitrogênio mineral absorvido e da massa vegetal da parte aérea das plantas de aveia preta.

A estirpe SEMIA816 e a cepa UFRGS Lc524, bem como as inoculações conjuntas de rizóbio e *T. harzianum* (U510 + *T. harzianum*, SEMIA816 + *T. harzianum*, UFRGS Lc322 + *T. harzianum*, e UFRGS Lc524 + *T. harzianum*) estimulam o crescimento e o acúmulo de N na parte aérea do cornichão.

Referências

- BARBOSA, M.A.G.; REHN; K.G.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 98-104, 2001.
- BARRIENTOS, L.; HIGUERA, M.; ACUÑA, H.; GUERRERO, J.; ORTEGA, F.; SEGUEL, I. et al. Efectividad simbiótica de cepas

naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en plantas de tres especies del genero *Lotus*. **Agricultura Técnica**, v.62, n.2, p. 226-236, 2002.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: Environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology** v.7, p. 249-260, 2004.

BLOEMBERG, G.V. & LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 4, p. 343-350, 2001.

CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola y interacciones microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**. v. 48, n. 2, 154-161, 2006.

CHEN, X.C.; FENG, J.; HOU, B.H.; LI, F.Q.; LI, Q.; HONG, G.F. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research** v. 33, p. 2540-2548, 2005.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO RS/SC – CQFS-RS/SC. **Manual de adubação e de calagem para o Estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre: SBCS/Núcleo Regional Sul, 2004, 400 p.

CORRÊA, E.B. & BETTIOL, W. Controle Biológico da Podridão de Raízes Causada por *Pythium* spp. em Cultivos Hidropônicos. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. 26 p. : il. — (Embrapa Meio Ambiente. Documentos; 77).

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 growthpromoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 159, p. 371-394, 2004.

FERREIRA, D.F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.

FRIZZO, M.L.S. Seleção e Caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr. 2007. 68 p. **Dissertação (Mestrado)** – Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GÖRGEN, C.A.; SILVEIRA NETO, A.N.; CARNEIRO, L.C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, p. 1583-1590, 2009.

HARMAN, G.E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease** v.84, n.4, p. 377-393, 2000.

MACHADO, R.G. Promoção de crescimento em gramíneas forrageiras por rizóbios isolados de *Lotus corniculatus*. 2011. 58p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

METIVIER, J.R. Citocininas e giberelinas. In: FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo: EDUSP, 1986, v.2, cap.4 e 5, p.93-162.

OSORIO FILHO, B.D. Rizóbios eficientes em *Lotus* em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado. 2009. 113p. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant–rhizobia interactions. **Plant, Cell & Environment**. v. 26, n. 189-199, 2003.

RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances** v. 17, p. 319-339, 1999.

SABER, W.I.A.; ABD EL-HAI, K.M. & GHONEEM, K.M. Synergistic effect of *Trichoderma* and *Rhizobium* on Both Biocontrol of Chocolate Spot Disease and Induction of Nodulation, Physiological Activities and Productivity of *Vicia faba*. **Research Journal of Microbiology**, v.4, n.8, p.286-300, 2009.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**,

Piracicaba, v.1, n.3, p.231-234, 1975.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; VOSS, M. & JACQUES, A.V.A. Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em vasos de Leonard. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 687-693, 2001.

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

SINDHU, S.S. & DADARWAL K.R. Chitinolytic and cellulotic *Pseudomonas* sp.: Antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. **Microbiological Research**, v. 156, p. 353-358, 2001.

TAIZ, L. & ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3° ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, 719. p.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2° ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; ABD EL-FATTAH, F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJIN, F.; REDEMAKER, J., MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ-MOLINA, E.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; MATEOS, P.F.; VELASQUEZ, E.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 28, p. 845-870, 2001.

Submetido em: 16/12/2010

Aceito em: 22/09/2011

Revisão do Abstract: CCAA-Sul (Santa Maria, RS)