UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal

Tese

Desempenho de plantas de canola originadas de sementes microbiolizadas com bactérias promotoras de crescimento

Anelise Tessari Perboni

Pelotas, 2014

Anelise Tessari Perboni

Desempenho de plantas de canola originadas de sementes microbiolizadas com bactérias promotoras de crescimento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P427d Perboni, Anelise Tessari

Desempenho de plantas de canola originadas de sementes microbiolizadas com bactérias promotoras de crescimento / Anelise Tessari Perboni. - 98f. ; il. - Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. - Orientador Marcos Antonio Bacarin.

1.Fisiologia vegetal. 2.Canola. 3.*Brassica napus* var. *oleifera*. 4.Promoção do crescimento. 5.Microbiolização. 6.Fotossíntese. 7.Fluorescência da clorofila *a*.I.Bacarin, Marcos Antonio. II.Título.

CDD: 664.36

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcos Antonio Bacarin (presidente)

Prof. Dr. Dario Munt de Moraes

Prof[a]. Dr[a]. Andréa Bittencourt Moura

Dr. Ariano Martins de Magalhães Júnior

Dr[a]. Emanuela Garbin Martinazzo

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor Marcos Antonio Bacarin, pela orientação, ensinamentos, confiança, amizade e pela oportunidade de crescimento profissional.

Aos professores e pesquisadores Dario Munt de Moraes, Andréa Bittencourt Moura, Ariano Martins de Magalhães Júnior e Emanuela Garbin Martinazzo pela participação na banca examinadora.

Aos integrantes do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, em especial a professora Andréa Bittencourt Moura, pela preciosa colaboração para que este trabalho fosse realizado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu namorado, Carlos André Bahry, pelo amor, companheirismo, compreensão, amizade e por sempre me incentivar a seguir os meus sonhos.

Aos meus pais, Nelson Paulo Perboni (*in memoriam*) e Aire Beatriz Tessari Perboni pelos exemplos de vida, dedicação e amor e ao meu querido irmão, Iuri Tessari Perboni.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela convivência e amizade, em especial a Emanuela Garbin Martinazzo, Dominique dos Santos Delias e Márcio Espinosa de Farias.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica, Douglas Antônio Posso, Monica Tamires Tejada e Ana Carolina Galdino pelo auxílio na condução dos experimentos.

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

Perboni, Anelise Tessari. **Desempenho de plantas de canola originadas de sementes microbiolizadas com bactérias promotoras de crescimento**. Universidade Federal de Pelotas. 2014. 98f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O trabalho teve como objetivo avaliar as características fotossintéticas, o crescimento e a produção de plantas de canola originadas de sementes microbiolizadas com bactérias promotoras de crescimento. Foram desenvolvidos ensaios sequenciais utilizando diferentes isolados de bactérias promotoras de crescimento em associação com híbridos de canola. No primeiro ensaio foram utilizados 96 isolados para a seleção massal de bactérias promotoras de crescimento. Foram avaliados os parâmetros do Teste JIP obtidos a partir da fluorescência da clorofila, a área foliar e a massa seca da parte aérea de plantas do híbrido Hyola 433 aos 55 dias após a semeadura (DAS). O segundo ensaio foi desenvolvido em duas etapas com isolados selecionados no ensaio I: na etapa I avaliaram-se a fluorescência da clorofila, trocas gasosas e a massa seca da parte aérea das plantas do híbrido Hyola 433 por meio de três medições em diferentes períodos do ciclo da cultura; na etapa II procedeu-se a contagem das plântulas emergidas, avaliação da fluorescência da clorofila, área foliar, massa seca das folhas e dos pecíolos e caules nas plantas do híbrido Hyola 61 aos 41 DAS. No terceiro ensaio foram utilizados os isolados DFs 104, DFs 320, DFs 513 e DFs 628, selecionados nos experimentos anteriores; avaliou-se a emergência de plântulas, os índices de performance, a área foliar, a partição de massa seca e o índice de clorofila durante o crescimento das plantas. Ao final do experimento foram determinados os componentes de produção por planta e a composição de ácidos graxos dos grãos. A correlação entre os parâmetros do Teste JIP e as variáveis de crescimento permitiu a determinação de parâmetros de interesse (F_0/F_M, F_V/F_0, ABS/RC, TR_0/RC, φ_{Po}, PI_{abs} e PI_{total}) para seleção de isolados com potencial para promoção de crescimento das plantas. De forma geral, os parâmetros do Teste JIP foram capazes de detectar modificações no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons nas plantas dos diferentes tratamentos, contudo as respostas apresentaram-se bastante variáveis em cada ensaio. Alguns isolados promoveram aumento dos parâmetros de crescimento destacando-se DFs 320, DFs 513 e DFs 628, os quais também apresentaram tendências de incremento dos componentes de produção. Além disso, estes isolados não modificaram a composição de ácidos graxos dos grãos de canola, ou seja, a microbiolização das sementes pode promover o crescimento das plantas sem provocar alterações na qualidade do óleo obtido. Conclui-se que a fluorescência da clorofila *a* pode ser utilizada nas avaliações das respostas fotossintéticas das plantas provenientes de sementes microbiolizadas com isolados bacterianos. A microbiolização das sementes com os isolados bacterianos DFs 320 [não identificado], DFs 513 [*Pseudomonas veronii*] e DFs 628 [*Bacilus* sp.] promove aumento do crescimento das plantas de canola do híbrido Hyola 61.

Palavras chave: *Brassica napus* var. *oleifera*; promoção de crescimento; microbiolização; fotossíntese; fluorescência da clorofila *a*.

ABSTRACT

Perboni, Anelise Tessari. **Performance of canola plants originated from seeds microbiolized with growth-promoting bacteria**. Universidade Federal de Pelotas. 2014. 98f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The work aimed to evaluate the photosynthetic traits, growth and production of canola plants originated from seeds microbiolized with growth-promoting bacteria. Sequential tests were developed using different isolates of growth-promoting bacteria in association with canola hybrids. In the first test, 96 isolates were used for the mass selection of growth-promoting bacteria. JIP test parameters obtained from the chlorophyll fluorescence, leaf area and shoot dry weight of the Hyola 433 hybrid were evaluated at 55 days after sowing (DAS). The second test was conducted in two stages with isolates selected in the test I: in the stage I, chlorophyll fluorescence, gas exchange and shoot dry weight of Hyola 433 hybrid were evaluated through three measurements in different periods of the crop cycle; in the stage II, the seedlings emerged, chlorophyll fluorescence, leaf area, leaves, petioles and stems dry weight in plants of the Hyola 61 hybrid were evaluated at 41 DAS. In the third test, the isolated DFs 104, DFs 320, DFs 513 and DFs 628 were used, selected in previous experiments; the seedling emergence, performance indexes, leaf area, dry matter partitioning and chlorophyll index were evaluated during the plants growth. At the end of the experiment, the yield components per plant and grain composition of fatty acids were determined. The correlation between the JIP test parameters and growth variables allowed the determination of interest parameters (F_0/F_M, F_V/F_0, ABS/RC, TR_0/RC, φ_{Po}, PI_{abs} and PI_{total}) for selection of isolates with potential to promote plant growth. Generally, the JIP test parameters were able to detect changes in the operation of the electron transport chain in plants of different treatments; however the responses were highly variable in each test. Some isolates caused an increase of the growth parameters especially DFs 320, DFs 513 and DFs 628 which also showed trends of increase of yield components. In addition, these isolates did not change the fatty acid composition of canola grains, i.e., the seed microbiolization can promote plant growth without causing changes in the quality of oil obtained. We conclude that chlorophyll fluorescence can be used in the evaluation of photosynthetic responses of plants from seeds microbiolized with bacterial isolates. The seeds microbiolization with bacterial isolates DFs 320 [unidentified], DFs 513 [*Pseudomonas veronii*] and DFs 628 [*Bacillus* sp.] promotes increase of Hyola 61 hybrid canola plants growth.

Keywords: *Brassica napus* var. *oleifera*; growth promotion; microbiolization; photosynthesis; chlorophyll *a* fluorescence.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 9
2. REVISÃO DE LITERATURA 10
2.1. A cultura da canola 10
2.2. Microrganismos promotores do crescimento de plantas 12
2.2.1. Rizosfera 13
2.2.2. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas 14
2.2.3. Mecanismos de promoção do crescimento de plantas 16
2.2.3.1. Fixação biológica de nitrogênio 16
2.2.3.2. Solubilização de fosfato 18
2.2.3.3. Produção de sideróforos 19
2.2.3.4. Produção de reguladores de crescimento 20
2.2.3.5. Atividade da 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase 21
2.2.3.6. Mecanismos indiretos 22
2.3. Fotossíntese: Fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas 23
3. MATERIAL E MÉTODOS 26
3.1. Ensaio I - Seleção massal de bactérias promotoras do crescimento de plantas de canola 26
3.2. Ensaio II 33
3.2.1. Etapa I: Fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e crescimento de plantas do híbrido de canola Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos 33
3.2.2. Etapa II: Emergência, fluorescência da clorofila *a* e crescimento de plantas do híbrido de canola Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos 35
3.3. Ensaio III - Emergência, fluorescência da clorofila *a*, crescimento e produção de plantas do híbrido de canola Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos 36
4. RESULTADOS 38
4.1. Ensaio I 38
4.2. Ensaio II 46
4.2.1. Etapa I 46
4.2.2. Etapa II 53
4.3. Ensaio III 57
5. DISCUSSÃO 64
6. CONCLUSÃO GERAL 77

7. REFERÊNCIAS **78**
ANEXO A **95**
ANEXO B **96**
ANEXO C **97**
ANEXO D **98**

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por energias renováveis está levando a um aumento nítido do uso de matérias-primas agrícolas para a produção de biocombustíveis. A canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) está entre as espécies utilizadas para esta finalidade e vem se destacando como a cultura de inverno de maior importância econômica no cenário mundial, ocupando hoje a terceira posição entre as oleaginosas em produção, principalmente pelo alto teor de óleo e composição química do grão, além do fornecimento de farelo com elevado conteúdo proteico.

Cotada pelo mesmo valor da soja no mercado, a canola é a principal fonte para obtenção de biodiesel na Europa, onde 70% de sua produção são destinadas a este processo e onde também não há mais áreas para expansão das lavouras. Tal fato, associado ao aumento do poder aquisitivo do brasileiro e da preocupação com a qualidade alimentar da população, vem despertando novos horizontes para a cultura da canola no Brasil.

A busca por tecnologias limpas, que não ofereçam riscos ao meio ambiente e ao ser humano, ganha cada vez mais destaque. Os resultados de pesquisas e a conscientização a cerca dos efeitos prejudiciais dos fertilizantes químicos e agrotóxicos, juntamente com o alto custo de aquisição destes insumos, justificam os estudos sobre o uso de inoculantes bacterianos para a promoção do crescimento vegetal e controle de patógenos.

Neste sentido, as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR - promoting growth plant rhizobacteria) podem favorecer o desenvolvimento vegetal através de vários mecanismos, seja por meio da produção de substâncias reguladoras do crescimento, pelo aumento na disponibilidade de nutrientes na rizosfera, bem como pelo controle de fitopatógenos.

Em sistemas sustentáveis, o uso de PGPR pode ser uma das alternativas tecnológicas viáveis para aumentar a produção, podendo ser implantada pela microbiolização de sementes.

Os efeitos destes microrganismos no desenvolvimento das plantas são investigados em várias culturas e seus benefícios em biossistemas específicos amplamente relatados na literatura. Contudo, tais resultados provêm, na maioria das vezes, de medidas biométricas de crescimento, sendo a avaliação das características fotossintéticas pouco empregada.

A capacidade fotossintética das plantas tem sido intensamente estudada, uma vez que a fotossíntese é o processo inicial para a produção de biomassa. Vários métodos são descritos na literatura e utilizados para verificar as características fotossintéticas de plantas. Dentre esses métodos, a análise da fluorescência da clorofila *a* tem se tornado uma ferramenta altamente eficiente para obtenção de informações relacionadas ao transporte de elétrons e aos fatores que afetam diretamente ou indiretamente a cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese. Esta técnica possibilita também a identificação de genótipos que apresentam melhor aproveitamento da energia absorvida pelos fotossistemas, e que potencialmente possam gerar mais poder redutor e ATP utilizados na redução do CO_2.

A associação da avaliação da fluorescência transiente da clorofila *a* com medições de trocas gasosas da superfície foliar permite a compreensão do metabolismo fotossintético como um todo, englobando a elucidação dos processos biofísicos responsáveis pela conversão da energia luminosa em energia química e dos processos bioquímicos de assimilação do CO_2 da atmosfera nas plantas.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as características fotossintéticas, o crescimento e a produção de plantas de canola originadas de sementes microbiolizadas com bactérias promotoras de crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da canola

Espécie da família *Brassicaceae*, a canola é cultivada em regiões de clima temperado e ocupa a posição de terceira oleaginosa mais importante no agronegócio mundial (CONAB, 2012). No Brasil, cultiva-se apenas canola da espécie *Brassica napus* L. var. *oleifera* que foi desenvolvida por melhoramento genético de colza, planta da espécie *Brassica napus* (TOMM, 2007).

O cultivo de colza teve início no Canadá em 1942, com o objetivo de fornecer óleo para utilização em lamparinas e motores a vapor (GENE TECHNOLOGY REGULATOR, 2008), sendo posteriormente introduzido como óleo comestível na Ásia (CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, 2009). Apenas após 1974 houve um incremento de sua utilização na alimentação humana pelas nações ocidentais, em virtude da criação de variedades de *Brassica napus* com teores reduzidos de

ácido erúcico e glucosinolatos que passaram a ser conhecidas pelo nome de canola (CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, 2009).

O nome canola (derivado da expressão CANadian Oil Low Acid) foi inicialmente registrado para referir-se ao óleo, torta, grãos e farelo provenientes de variedades resultantes de melhoramento genético, que continham menos que 2% de ácido erúcico no óleo e no máximo 30 µmoles de glucosinolatos por grama de componente sólido seco do grão (SANTOS et al., 2001). Atualmente, canola é um termo genérico internacional e não mais uma marca registrada.

No Brasil cultiva-se canola em uma área de aproximadamente 40 mil hectares, sendo estes responsáveis pela produção anual de 53 mil toneladas. O Rio Grande do Sul é o maior produtor dos grãos com 26 mil hectares cultivados anualmente (CONAB, 2012). Segundo Peres et al. (2005), a produção nacional de grãos de canola é insuficiente em relação à demanda, atendendo apenas 30% do consumo, o que evidencia a grande potencialidade de expansão da cultura.

O principal uso da canola está na alimentação humana onde o consumo de seu óleo tem sido indicado por médicos e nutricionistas como um alimento funcional por possuir grande quantidade de ácidos graxos insaturados e alta percentagem de ácido oleico (BUTKUTĖ et al., 2006). Além disso, os grãos de canola também são utilizados como matéria prima para a produção de biodiesel e, no caso do farelo, para a formulação de rações (TOMM, 2007).

A canola também possui grande importância como excelente alternativa para a rotação de culturas, particularmente com o trigo, pela redução do inóculo de doenças causadas por fungos necrotróficos que comprometem o rendimento e a qualidade dos grãos produzidos (TOMM, 2007).

No mercado brasileiro existem vários genótipos de canola disponíveis, os quais têm comercialização assegurada da produção por empresas interessadas no refino do óleo comestível (TOMM, 2005). Os híbridos Hyola 43 e Hyola 60, com resistência a canela-preta (doença fúngica de grande importância na cultura) viabilizaram o início da expansão da área de cultivo de canola no Brasil. Contudo, devido aos relatos de infecção do fungo causador da canela-preta nestes genótipos, os mesmos vêm sendo substituídos, nas últimas safras, pelos híbridos Hyola 61, Hyola 411 e Hyola 433 com resistência poligênica que tende a ser mais durável e estável do que a resistência associada a apenas três genes de Hyola 43 e Hyola 60 (TOMM, 2009).

Com o aumento potencial da implantação dessa cultura torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas buscando informações sobre a mesma para as condições brasileiras, uma vez que o rendimento da canola no Brasil é mais limitado por falhas em aplicar, modificar e ajustar fatores de produção do que pelas condições edafoclimáticas do país (TOMM, 2007).

2.2. Microrganismos promotores do crescimento de plantas

O crescimento e o desenvolvimento das plantas em solos agricultáveis são influenciados por diversos fatores bióticos e abióticos. A comunidade microbiana na rizosfera é representada por populações diversificadas em estado de equilíbrio dinâmico, refletindo o ambiente físico, químico, biológico e suas relações (EHRENFELD et al., 2005).

Dentre a ampla gama de organismos que coexistem no solo, diferentes gêneros de bactérias são componentes vitais deste ecossistema e estão envolvidos em vários processos, tornando-o dinâmico na reciclagem de nutrientes e sustentável para a produção das culturas (AHEMAD et al., 2009).

As bactérias do solo interagem especificamente com as raízes das plantas, na rizosfera, onde sua densidade é bastante elevada (HAGHIGHI et al., 2011). Estes microrganismos podem ser classificados de acordo com os seus efeitos sobre as plantas e a forma como eles interagem com as raízes. As bactérias que colonizam a rizosfera ou raízes e exercem efeito benéfico sobre as plantas são denominadas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR - promoting-growth plant rhizobacteria) (ABBASI et al., 2011).

PGPR são capazes de estimular o crescimento da planta através da mobilização de nutrientes e melhorias na estrutura do solo, produção de reguladores de crescimento, controle ou inibição da atividade de fitopatógenos, biorremediação de elementos contaminantes do solo como metais pesados e agroquímicos (RICHARDSON et al., 2009; AHEMAD & MALIK, 2011; BULGARELLI et al., 2013), entre outros mecanismos.

Na era da produção agrícola sustentável, as interações planta-microrganismo que ocorrem na rizosfera desempenham um papel de grande importância na transformação, mobilização e solubilização de nutrientes que serão absorvidos pela planta para desenvolver seu máximo potencial genético (HAYAT et al., 2010). As abordagens biológicas para melhoria da produção agrícola estão tornando-se cada

vez mais populares, pela necessidade atual de se estabelecer alternativas adicionais à adubação com fertilizantes químicos (SAHARAN & NEHRA, 2011).

As rizobactérias são alternativas ideais para proteção das culturas, pela possibilidade de aplicação às sementes ou pela mistura com o solo durante a semeadura ou transplante. Representam uma ferramenta potencialmente valiosa para o controle de doenças, principalmente, em sistemas de produção de alto valor associado, onde há escassez de produtos químicos registrados ou, quando disponíveis, apresentam baixa eficácia (ZEHNDER et al., 2001).

Neste contexto, uma ampla investigação tem sido desenvolvida em todo o mundo, com o objetivo de explorar rizobactérias que possuem, além das propriedades de promoção do crescimento vegetal, outras características como potencial de desintoxicação de metais pesados no solo (MA et al., 2011a), degradação/tolerância a agroquímicos (AHEMAD & KHAN, 2012a), tolerância a estresse abióticos (PATEL et al., 2012; GURURANI et al., 2013) entre outras.

As PGPR têm sido identificadas em diversos gêneros incluíndo *Acinetobacter*, *Azospirillium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Ralstonia* (SUDHAKAR et al., 2000; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; KARAKURT & KOTAN, 2011). Embora os mecanismos envolvidos na promoção do crescimento de plantas, mediado por rizobactérias, não estejam completamente elucidados, várias descobertas têm sido descritas na literatura.

Este conhecimento a respeito do cenário atual da utilização de microrganismos na busca da promoção do crescimento vegetal, e de seu desempenho em diferentes agro-ecossistemas, amplia as perspectivas da aplicabilidade das PGPR nas mais variadas culturas.

2.2.1. Rizosfera

A rizosfera compreende a porção do solo que rodeia o sistema radicular, sendo o termo rizobactérias empregado para definir um grupo de bactérias associado a este ambiente (DOBBELAERE et al., 2003).

Além de proporcionar suporte mecânico, água e nutrientes, as raízes também executam outras funções mais especializadas na rizosfera, que contam com a síntese e exsudação de metabólitos (BERTIN et al., 2003). Compostos como carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, fenóis, ácidos graxos, vitaminas e

enzimas compreendem os principais exsudatos secretados pela raiz (CARVALHAIS et al., 2011).

Através do processo de secreção radicular, os microrganismos são atraídos por quimiotaxia em direção aos exsudatos liberados que servirão como substrato metabólico, juntamente com os produtos da decomposição das células mortas das raízes (rizodeposição) (BULGARELLI et al., 2013). Ao metabolizar as fontes de carbono e nitrogênio provenientes destes compostos, algumas moléculas produzidas pelos microrganismos serão re-absorvidas pelas plantas e utilizadas em seu crescimento e desenvolvimento (KANG et al., 2010).

Cabe salientar, que a composição dos exsudatos radiculares é dependente do estado fisiológico e da espécie da planta, assim como dos microrganismos presentes no solo (KANG et al., 2010). Sendo assim, os compostos liberados pelas raízes podem estimular relações benéficas às plantas, alterar as propriedades do solo bem como repelir organismos deletérios e inibir o crescimento de espécies competidoras (MATHESIUS & WATT, 2011).

2.2.2. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas

O termo rizobactérias foi inicialmente introduzido na década de 70 para designar bactérias não simbióticas que ocorrem naturalmente no solo e possuem a capacidade de colonizar as raízes e estimular o crescimento das plantas (KLOEPPER & SCHROTH, 1978),

Com o passar dos anos e os avanços no conhecimento das relações entre a microbiota, a rizosfera e as raízes das plantas, novas definições foram estabelecidas. De acordo com Vessey (2003) as espécies de bactérias do solo que crescem na rizosfera, em torno das raízes ou dentro de tecidos vegetais e estimulam o crescimento das plantas, por uma infinidade de mecanismos, são conhecidas coletivamente como PGPR.

Entretanto, Gray & Smith (2005) incluíram as bactérias que estabelecem relações simbióticas com a planta no grupo das rizobactérias propondo um novo conceito de classificação destes microrganismos: as PGPR intracelulares (iPGPR), as quais englobam as bactérias que habitam o interior das células da raiz, produzem nódulos e geralmente estão localizadas dentro destas estruturas especializadas; e as PGPR extracelulares (ePGPR), que compreendem as bactérias que se desenvolvem na rizosfera, rizoplano ou nos espaços entre as células do córtex da

raiz, sem a formação de nódulos, mas com capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de sinais ou substâncias específicas.

Atualmente, as bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas dentre as iPGPR. No grupo das ePGPR, os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia* têm sido o foco da maioria das pesquisas (SILVEIRA, 2008). Deve-se destacar a existência de rizobactérias que podem se estabelecer tanto no interior, quanto no ambiente externo à célula, encaixando-se em ambos os grupos, como por exemplo, as pertencentes ao gênero *Burkholderia* (GRAY & SMITH, 2005).

O uso potencial de PGPR para estimular o crescimento e aumentar a produção das plantas tem evoluído ao longo dos últimos anos devido aos estudos desenvolvidos a cerca deste tema, bem como do sucesso na reprodutibilidade dos resultados obtidos nos experimentos de campo (FARZANA et al., 2009).

Incrementos no crescimento e na produtividade têm sido relatados em uma série de culturas, climas, solos e faixas de temperatura, em resposta a aplicação de PGPR. Por exemplo, em plantas de trigo cultivadas em casa de vegetação, a produção de grãos e a biomassa total de plantas aumentaram em 34 e 39%, respectivamente, devido à microbiolização de sementes com *Azorhizobium caulinodans* (WEYENS et al., 2009). Por outro lado, o tratamento de sementes de milho com *Pseudomonas alcaligenes*, *Bacillus polymyxa* e *Mycobacterium phleistrains* aumentou significativamente a massa seca total das plantas cultivadas em casa de vegetação em até 38% (EGAMBERDIYEVA, 2007).

Estudos desenvolvidos a campo no Brasil com trigo e milho, também tem demonstrado que a utilização de rizobactérias, entre elas *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., promove a maximização do crescimento das plantas resultando no aumento do rendimento de grãos ao nível de 18 a 28% para o trigo e de 8 a 16% para o milho (LUZ, 2001a; 2001b).

Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* têm sido amplamente estudados e seus benefícios observados em várias culturas. Em plantas de cebola cultivadas em campo, originadas de sementes microbiolizadas com espécies correspondentes a estes gêneros, foram obtidos acréscimos de 15,7 a 24,4% na produção total de bulbos por hectare e de 4,3 a 13,5% na massa média de cada bulbo (HARTHMANN et al., 2010)

Além do uso isolado, as associações de rizobactérias têm apresentado resultados satisfatórios na promoção do crescimento vegetal. Em plantas de soja, a inoculação de sementes com três espécies de *Bacillus* e *Bradyrhizobium japonicum* proporcionou o aumento de crescimento bem como dos níveis de nodulação das raízes tanto em casa de vegetação como em condições de campo (BAI et al., 2003).

Assim, os amplos benefícios ocasionados pela associação das PGPR aos vegetais, como o incremento da biomassa da planta e do volume de raízes, aumento do índice de germinação de sementes e emergência de plântulas, aceleração do crescimento, antecipação da colheita e acréscimos na produtividade ocorrem através de diversos mecanismos de promoção do crescimento presentes ao longo do ciclo da planta e que se alternam durante estádios de desenvolvimento específicos.

2.2.3. Mecanismos de promoção do crescimento de plantas

A complexa rede de interações que ocorre entre os vegetais e as PGPR pode afetar o crescimento da planta diretamente pela facilitação da aquisição de nutrientes (nitrogênio, fósforo e nutriente essenciais) e modulação de reguladores de crescimento ou indiretamente através da diminuição dos efeitos inibitórios de patógenos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (GLICK, 2012).

2.2.3.1. Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) à amônia (NH_3), através de um complexo enzimático denominado nitrogenase (BULGARELLI et al., 2013). Por meio deste mecanismo, compostos nitrogenados são fornecidos diretamente para as plantas por meio de associações, ou então, quando os microrganismos morrem, são liberados no ambiente (LINDERMANN & GLOVER, 2003).

O nitrogênio é um elemento essencial, necessário para a síntese celular de enzimas, proteínas, clorofilas, DNA e RNA, sendo extremamente importante para o crescimento das plantas e produção de alimentos (HAYAT et al., 2010). O suprimento de nitrogênio através da fixação biológica corresponde a aproximadamente dois terços de todo nitrogênio utilizado globalmente, enquanto o restante é industrialmente sintetizado (RUBIO & LUDDEN, 2008).

Acompanhando o expressivo aumento populacional, a necessidade de grandes quantidades de nitrogênio na agricultura tenderá a crescer com o passar dos anos a fim de suprir a demanda por alimentos. Com isso, a utilização de rizobactérias que promovem a fixação biológica deste elemento poderá reduzir as aplicações de fertilizantes químicos nitrogenados reduzindo os custos de produção e preservando o meio ambiente (STEFAN et al., 2008).

Os microrganismos fixadores de nitrogênio, também denominados diazotróficos, são geralmente classificados como: (a) bactérias simbióticas fixadoras de N_2, incluindo, além dos membros da família *Rhizobiaceae*, que apresentam simbiose com plantas leguminosas (AHEMAD & KHAN, 2012), os do gênero *Frankia* que estabelecem relação com plantas lenhosas não leguminosas; e (b) bactérias fixadoras de N_2 não-simbióticas que podem apresentar vida livre, associativa e endofítica tais como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azocarus* e cianobactérias (*Anabaena*, *Nostoc*) (BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

A fixação biológica por meio da simbiose que ocorre entre os rizóbios e as leguminosas é responsável pela fixação de até 460 kg de nitrogênio por hectare ao ano (BULGARELLI et al., 2013). Os rizóbios, os quais compreendem espécies da família *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium*), estabelecem relações simbióticas com leguminosas que resultam na formação de nódulos que são os sítios de fixação do nitrogênio (MATIRU & DAKORA, 2004).

Além de possibilitar que o N_2 atmosférico seja utilizado pelas leguminosas, vários estudos têm destacado que os produtos da fixação realizada pelos rizóbios também podem beneficiar plantas não leguminosas através da transferência direta aos cultivos consorciados ou às espécies subsequentes utilizadas na rotação de culturas (HAYAT et al., 2008). O isolamento do rizóbio como endófito natural tem ocorrido em várias espécies como, por exemplo, o milho (MARTINEZ-ROMERO et al., 2000).

As bactérias fixadoras de N_2 não simbióticas apresentam uma menor contribuição no fornecimento de nitrogênio para a planta hospedeira quando comparadas aos microrganismos simbiontes. No entanto, uma gama de PGPR estabelece interações com plantas como arroz, trigo, milho, cana de açúcar e algodão, promovendo fixação biológica de N_2 e aumentando significativamente o crescimento vegetativo e a produtividade de grãos (KENNEDY et al., 2004).

São diversos os exemplos de bactérias de vida livre que fixam nitrogênio biologicamente. As espécies do gênero *Azobacter* são expressivamente utilizadas em culturas como inoculantes, principalmente em associação com *Azospirillum* (TILAK et al., 2001). Estudos de inoculação com *Azobacter* demonstraram incremento no rendimento de plantas de algodão (ANJUM et al., 2007) e trigo (GHOLAMI et al., 2009).

Por sua vez, membros do gênero *Azospirillum* são bactérias diazotróficas que vivem em estreita associação com raízes de várias plantas hospedeiras, em especial os cereais. A associação de espécies de *Azospirillum* com as plantas promove aumento do desenvolvimento e rendimento do vegetal, atribuído, principalmente, a melhoria no desenvolvimento radicular e incrementos na absorção de água e de minerais, e em menor proporção a fixação biológica de N_2 (OKON & ITZIGSOHN, 1995). Estudos de inoculação com *Azospirillum brasilense* identificaram maior absorção de nitrogênio e aumento da concentração de proteínas nos grãos de plantas de trigo (SAUBIDET et al., 2000).

As espécies do gênero *Burkholderia* também são capazes de fixar N_2. *Burkholderia vietnamiens* foi utilizada em ensaio de campo para inoculação de arroz irrigado, na semeadura e transplante, ocasionando até 22% de aumento no rendimento de grãos (TRAN VÂN et al., 2000).

Também consideradas como diazotróficas, as bactérias do gênero *Herbaspirillum* caracterizam-se por ser endofíticas e colonizar as raízes de culturas como cana de açúcar, arroz, milho e outros cereais (JAMES et al., 2000). Ensaios realizados em arroz mostraram que a inoculação com *Herbaspirillum* pode promover a fixação de 31 a 45% do nitrogênio total de plântulas com 30 dias após a semeadura (BALDANI et al., 2000).

A fixação de nitrogênio e promoção do crescimento de plantas, também tem sido constatada em várias espécies da família *Enterobacteriaceae* entre elas *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e provavelmente em outras ainda não identificadas (KENNEDY et al., 2004).

2.2.3.2. Solubilização de fosfato

O fósforo, segundo nutriente limitante do crescimento das plantas depois do nitrogênio, é abundante nos solos em formas orgânicas e inorgânicas (KHAN et al., 2009). Porém, na maioria dos solos, o fósforo encontra-se indisponível para as

plantas que são capazes de absorver apenas suas formas solúveis (íons $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{-2}) (BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

Portanto, estratégias para maximizar a disponibilidade e absorção do fósforo podem contribuir significativamente para o crescimento e produtividade das culturas, uma vez que a fração prontamente disponível deste mineral para a planta corresponde a apenas 5% da quantidade total existente no solo (DOBBELAERE et al., 2003). Neste contexto, microrganismos com atividade de solubilização do fosfato podem atuar como substitutos ideais de fertilizantes químicos fosfatados, amplamente utilizados na agricultura (KHAN et al., 2006).

Tipicamente, a solubilização do fósforo inorgânico ocorre como consequência da produção de ácidos orgânicos (como acetato, sucinato, citrato e gluconato) que são sintetizados por vários grupos de bactérias do solo (BULGARELLI et al., 2013). Por outro lado, a mineralização do fósforo orgânico ocorre através da síntese de diferentes fosfatases que promovem a liberação de ácidos fosfóricos (GLICK, 2012).

Dentre os microrganismos que habitam a rizosfera, as rizobacérias solubilizadoras de fosfato são consideradas biofertilizantes promissores, podendo fornecer fósforo para as plantas a partir de fontes pouco aproveitáveis através de vários mecanismos (ZAIDI et al., 2009). *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* são relatados como os gêneros de PGPR mais eficientes neste processo (SAHARAN & NEHRA, 2011).

Os efeitos benéficos da inoculação com diversos gêneros de rizobactérias solubilizadoras de fosfato, utilizadas de forma isolada (AHEMAD & KHAN, 2012a; CHEN et al., 2008) ou em combinação com outros microrganismos rizosféricos (VIKRAM & HAMZEHZARGHANI, 2008) têm sido amplamente relatados.

2.2.3.3. Produção de sideróforos

Semelhante ao fósforo, o ferro é abundante no solo, mas não se encontra disponível para as plantas em grandes quantidades, devido à baixa solubilidade dos óxidos de ferro (III) (RAJKUMAR et al., 2010).

As plantas desenvolveram diferentes estratégias para combater esta limitação como a liberação de prótons e ácidos orgânicos pelas raízes para diminuir o pH do solo e aumentar assim a disponibilidade de ferro e/ou a liberação de moléculas de baixo peso molecular (sideróforos) que podem se ligar ao mineral e, em seguida, ser absorvidas pelas células da raiz (JEONG & GUERINOT, 2009).

Assim como as plantas, as rizobactérias podem produzir uma ampla gama de sideróforos atuando como agentes quelantes de ferro a partir de compostos minerais ou orgânicos em condições de limitação do elemento (BULGARELLI et al., 2013).

Além da disponibilização de ferro para o desenvolvimento da bactéria, a formação do complexo ferro-sideróforo também impede a proliferação de patógenos devido à competição pelo nutriente no ambiente (DOBBELAERE et al., 2003).

Ao contrário dos fitopatógenos, as plantas não são prejudicadas pela depleção de ferro pela rizobactérias, pelo fato de conseguirem capturar complexos ferro-sideróforos bacterianos utilizando o ferro liberado bem como o sideróforo, que será reciclado ou então destruído (RAJKUMAR et al., 2010).

Vários trabalhos identificaram a promoção do crescimento vegetal por rizobactérias capazes de produzir sideróforos. Por exemplo, em estudo realizado em plantas de *Arabidopsis thaliana*, constatou-se a absorção de complexos ferro-pioverdinas sintetizados por *Pseudomonas fluorescens*, levando a um aumento da concentração de ferro no interior dos tecidos da planta e incremento do crescimento (VANSUYT et al., 2007). Além disso, vários pesquisadores têm relatado a efetiva redução da severidade de doenças fúngicas em plantas ocasionada por diversas espécies de rizobactérias que produzem sideróforos (DEY et al., 2004).

2.2.3.4. Produção de reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são compostos químicos que influenciam e promovem o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo muitas vezes divididos em cinco grandes grupos - auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno - embora já se tenha reconhecido a atividade hormonal em outros compostos como brassinosteróides e estrigolactonas (SANTNER & ESTELLE, 2009).

Moléculas que pertencem ao grupo das auxinas, destacando-se o ácido indol acético (AIA) como mais abundante, estão envolvidas em muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal (BULGARELLI et al., 2013). Além de mais abundante, o AIA é a auxina fisiologicamente mais ativa nas plantas e tem sido foco da maioria dos estudos ligados à produção de reguladores de crescimento por rizobactérias. Estima-se que 80% das bactérias isoladas da rizosfera possam produzir AIA (PATTEN & GLICK, 1996).

O AIA proveniente das rizobactérias promove a alteração do pool de AIA da planta ao ser absorvido, influenciando consequentemente todos os processos fisiológicos afetados por este hormônio. Além disso, o AIA apresenta um importante papel no aumento da superfície, área e comprimento das raízes ampliando o acesso à água e aos nutrientes no solo (GLICK, 2012).

Estudos com mudas de eucalipto cultivadas em substrato inoculado com rizobactérias produtoras de AIA demonstraram o aumento do enraizamento e da massa seca das raízes das plantas (TEIXEIRA et al., 2007). A inoculação de plantas de batata doce com isolados capazes de produzir AIA promoveu aumentos significativos no crescimento da planta e na absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, que podem estar vinculados aos benefícios no crescimento radicular (FARZANA & RADIZAH, 2005)

Dentre os inúmeros trabalhos realizados com rizobactérias, tem-se verificado que a maioria das espécies de *Rhizobium* produz AIA, fato este que pode estar associado aos processos de divisão e diferenciação celular e formação do feixe vascular, afetados pelo hormônio, que são essenciais à formação do nódulo (AHEMAD & KHAN, 2012b).

Além das auxinas, outros importantes reguladores de crescimento são produzidos por rizobactérias como as citocininas (SALAMONE et al., 2001), giberelinas (GUTIÉRREZ-MAÑERO et al., 2001) e o ácido abscísico (DOBBELAERE et al., 2003) e, embora estudados em menor escala, participam da promoção do crescimento das plantas bem como das respostas de defesa contra patógenos e estresses ambientais.

2.2.3.5. Atividade da 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase

O etileno é um hormônio produzido endogenamente por todas as plantas, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento adequado (SALEEM et al., 2007). Em situações de estresse, geradas, por exemplo, por seca, alagamento, salinidade, metais pesados e patógenos, o nível endógeno de etileno cresce significativamente (BHATTACHARYYA & JHA, 2012). Inicialmente, verifica-se um pico da concentração de etileno, induzido pelas condições adversas, o qual é considerado benéfico por promover respostas de defesa nas plantas (STEARNS & GLICK, 2003). Com a persistência do estresse há um segundo pico da concentração de etileno, mais acentuado que o primeiro, responsável por desencadear processos

de senescência, clorose e abscisão, causando assim um efeito inibitório para o crescimento da planta (STEARNS & GLICK, 2003).

Algumas PGPR podem interferir na biossíntese de etileno pela expressão da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase que cliva o ACC, o precursor imediato do etileno em todas as plantas superiores, produzindo α-cetobutirato e amônia (GLICK, 2005).

Atualmente, as PGPR que produzem ACC deaminase têm sido identificadas em vários gêneros como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Rhizobium* (SHAHAROONA et al., 2007; ZAHIR et al., 2008; KANG et al., 2010). Estas bactérias associam-se às raízes dos hospedeiros e podem atuar como drenos de ACC, limitando as respostas inibitórias do etileno sintetizado nos tecidos das plantas e promovendo o crescimento, principalmente em condições de estresse (CHENG et al., 2012).

Os principais efeitos relatados pela inoculação de sementes e raízes com rizobactérias que produzem ACC deaminase estão relacionados ao aumento da germinação (ZAFAR-UL-HYE et al., 2007), promoção do alongamento radicular e do crescimento da parte aérea e aumento da nodulação rizobial e absorção de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio (GLICK, 2012).

2.2.3.6. Mecanismos indiretos

O papel das rizobactérias no biocontrole de fitopatógenos, promovendo o crescimento da planta de forma indireta, tem sido um assunto de considerável interesse em termos de compreensão de alguns dos mecanismos envolvidos e da aplicabilidade comercial destes microrganismos com o objetivo de substituir produtos químicos.

O principal mecanismo indireto de promoção do crescimento vegetal está relacionado com a atuação das PGPR como agentes de biocontrole contra fitopatógenos (GLICK, 2012). Em geral, a exclusão competitiva, a indução de resistência e a produção de metabólitos antifúngicos são os principais mecanismos ligados a esta atividade (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

Muitas rizobactérias têm sido relatadas como produtoras de metabólitos antifúngicos como o ácido cianídrico e enzimas que degradam a parede celular dos fungos como quitinases e β-1,3-glucanases (PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2003). A interação de rizobactérias com as raízes das plantas pode resultar em resistência

contra algumas bactérias patogênicas, fungos e vírus caracterizando um fenômeno denominado resistência sistêmica induzida (ISR - induced systemic resistance), que é desencadeado por meio da liberação de vários compostos como, por exemplo, sideróforos e substâncias voláteis (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

A maioria das respostas no biocontrole por meio da inoculação com rizobactérias têm sido visualizada em plantas de *Arabidopsis thaliana*, contudo a ISR também é verificada em culturas como feijão, tabaco e tomate e por espécies pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Serratia* (SHORESH et al., 2010).

Dentre as rizobactérias biocontroladoras, as estirpes de *Bacillus subtilis* são as mais utilizadas devido à sua ampla capacidade de redução de doenças e produção de antibióticos, quando aplicadas no tratamento de sementes (KOKALIS-BURELLE et al., 2006). *Pseudomonas* fluorescentes são amplamente conhecidas pela supressão de fungos patogênicos no solo através da produção de metabólitos antifúngicos e pelo sequestro de ferro com a liberação de sideróforos na rizosfera tornando-o indisponível para outros organismos (DWIVEDI & JOHRI, 2003).

Várias espécies destes dois genêros de bactérias têm sido utilizadas em estudos de biocontrole de doenças. Por exemplo, em trabalho realizado com a microbiolização de sementes de tomate verificou-se a redução do percentual de folhas apresentando sintomas de murcha ocasionada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* através da utilização de isolados bacterianos dos genêros *Pseudomonas* e *Bacillus* (ROCHA & MOURA, 2013).

É importante observar, que além do controle de fungos e bactérias deletérias, estudos têm identificado efeitos positivos no controle de fitonematóides. Ensaios conduzidos em plantas de melão e melancia demostraram redução da severidade do ataque de nematóides com a aplicação de formulações compostas por rizobactérias (KOKALIS-BURELLE et al., 2003). Ainda, combinações de rizobactérias, utilizadas para microbiolizar sementes de arroz, promoveram o controle de *Meloidogyne graminicola* associado à promoção de crescimento das plantas (SOUZA JUNIOR et al., 2010)

2.3. Fotossíntese: Fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas

A fotossíntese, associada a uma série de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, é um processo chave para o crescimento e desenvolvimento da

planta (ASHRAF & HARRIS, 2013). A vida na Terra depende das transduções de energia dos processos fotossintéticos a partir da energia luminosa absorvida para a energia de excitação, energia de oxidoredução (transporte de elétrons) e, por fim, energia armazenada em estruturas ordenadas e na biomassa produzida (TSIMILLI-MICHAEL & STRASSER, 2013).

O comportamento energético do aparato fotossintético é fundamental na investigação da fotossíntese e pode ser avaliado por meio de medições da fluorescência da clorofila *a*. A análise da cinética da fluorescência da clorofila *a* é uma técnica não invasiva e confiável, amplamente utilizada em estudos desenvolvidos com organismos fotossintéticos oxigênicos (plantas superiores, algas e cianobactérias) no que diz respeito tanto à pesquisa básica quanto à pesquisa aplicada (STIRBET & GOVINDJEE, 2011).

Embora a fluorescência corresponda a uma fração muito pequena da energia não aproveitada no processo fotoquímico que é dissipada (aproximadamente 2-10%) (TRISSL et al., 1993), ela é facilmente mensurável e tem sido utilizada como uma ferramenta poderosa na investigação de eventos fisiológicos nas plantas e obtenção de informações detalhadas sobre a estrutura e funcionamento do aparelho fotossintético (DAYAN & ZACCARO, 2012).

Quando as folhas de plantas adaptadas ao escuro são iluminadas por luz actínica saturante, a emissão da fluorescência aumenta a partir de um nível mínimo (F_0 ou O) a um nível máximo (F_M ou P), em três fases distintas separadas por pelo menos dois passos intermediários, J e I (STRASSER et al., 1995), caracterizando a curva de indução de fluorescência ou curva OJIP. De acordo com a interpretação mais aceita, denominada modelo Q_A e proposta por Duysens e Sweers (1963), este aumento de fluorescência está diretamente relacionado ao estado redox da quinona A [Q_A] (STIRBET & GOVINDJEE, 2012).

A excitação do fotossistema II (FSII) adaptado ao escuro conduz à formação reversível do par radical primário $P_{680}^{+}Feo^{-}$ que pode ser eficientemente utilizado na redução da Q_A, resultando no decréscimo da captura de elétrons pelo centro de reação (RC) e no aumento da dissipação da energia luminosa absorvida, como fluorescência e calor (JOLY et al., 2009).

Dessa forma, a indução da fluorescência reflete o fechamento dos RC do FSII após o acúmulo de Q_A reduzida, o qual, também é dependente da cinética de oxidação pelo aceptor secundário quinona B e da entrada de elétrons a partir do

lado doador do FSII (BUKHOV et al., 2004). Portanto, as alterações que ocorrem durante a indução da fluorescência podem ser essencialmente correlacionadas com os eventos sucessivos de oxidação/redução dos aceptores de elétrons da cadeia de transporte de elétrons fotossintético como um todo (PAPAGEORGIOU & GOVINDJEE, 2004).

Com base na teoria dos fluxos de energia em biomembranas (STRASSER, 1978), a avaliação da cinética de emissão da fluorescência transiente pode ser descrita utilizando-se o Teste JIP (STRASSER & STRASSER, 1995).

O Teste JIP fornece uma série de parâmetros, dentre os quais estão, principalmente, as estimativas de fluxos de energia por centro de reação ou por secção transversal (área) da amostra, e as razões entre os diferentes fluxos de energia (STIRBET & GOVINDJEE, 2011). Estes parâmetros são calculados utilizando-se os valores das intensidades de fluorescência, registrados através de medições do transiente OJIP, que levam em consideração uma série de hipóteses sobre o funcionamento do aparelho fotossintético, tais como a conversão de energia de excitação e as características peculiares das fases da transferência de elétrons entre os dois fotossistemas (TSIMILLI-MICHAEL & STRASSER, 2008).

A seleção adequada dos parâmetros matemáticos propostos pelo Teste JIP, permite quantificar a energia absorvida e aproveitada no sistema fotossintético, podendo também avaliar o desempenho fotossintético das plantas (TSIMILLI-MICHAEL & STRASSER, 2008).

Atualmente, a fluorescência da clorofila *a*, além de amplamente empregada em investigações do transporte de elétrons, é utilizada para a compreensão do processo de assimilação de CO_2 em folhas. A combinação desta técnica com a avaliação das trocas gasosas, por meio de analisadores de gases no comprimento de onda infravermelho, possibilita a compreensão do metabolismo fotossintético associando às reações fotoquímicas e bioquímicas da fotossíntese (MARTINAZZO, 2011).

Medições das trocas gasosas típicas são empregadas principalmente para quantificar os fluxos de CO_2 e água que ocorrem nas superfícies foliares permitindo também o entendimento do mecanismo de abertura e fechamento estomático (ENNAHLI & EARL, 2005).

A variação diária da assimilação de CO_2 e as curvas de resposta da fotossíntese em relação ao aumento da densidade de fluxo de fótons

fotossinteticamente ativos, temperatura e concentração de CO_2, são amplamente verificadas em diversos trabalhos sendo utilizadas para desenvolver modelos de predição das respostas das culturas às mudanças climáticas globais (RUIZ-VERA et al., 2013), obter características fotossintéticas das espécies (ZHANG & LIU, 2012) e para verificar os efeitos das condições de crescimento e estresses sobre a fotossíntese (HE et al., 2010; ARANJUELO et al.; 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e no Laboratório de Metabolismo Vegetal e casa de vegetação do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, ambos pertencentes à Universidade Federal de Pelotas (UFPel), situada no município do Capão do Leão no Rio Grande do Sul.

3.1. Ensaio I - Seleção massal de bactérias promotoras do crescimento de plantas de canola

Foram utilizadas sementes do híbrido de canola Hyola 433 para desenvolver este ensaio. Os 96 isolados bacterianos destinados para a seleção de bactérias promotoras do crescimento são apresentados na Tabela 1 e foram provenientes da coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal.

Os dados meteorológicos de temperaturas mínima, máxima e média diária, insolação, radiação solar e número de dias de geada do período correspondente à realização do ensaio foram coletados na Estação Agroclimatológica de Pelotas - Convênio EMBRAPA/UFPEL, localizada a aproximadamente 1000 metros da casa de vegetação onde foi desenvolvido o estudo, e são apresentados no Anexo A.

Tabela 1. Representação numérica, identificação e habitat dos 96 isolados utilizados na seleção massal de bactérias promotoras do crescimento em plantas do híbrido de canola Hyola 433

Representação numérica	Tratamentos	Identificação*	Identidade**	Habitat
0	Testemunha	-	-	-
1	DFs 39	Não identificado	-	Túnica de alho
2	DFs 77	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
3	DFs 83	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
4	DFs 93	*Bacillus cereus*	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
5	DFs 96	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
6	DFs 104	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
7	DFs 109	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
8	DFs 113	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
9	DFs 119	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
10	DFs 127	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
11	DFs 144	*Bacillus thuringiensis*	98 %	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
12	DFs 149	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
13	DFs 150	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
14	DFs 152	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
15	DFs 155	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel I)
16	DFs 185	*Pseudomonas synxatha*	100%	Sementes de arroz
17	DFs 256	Não identificado	-	Solo - laranjeira (Pelotas I)
18	DFs 306	Não identificado	-	Sementes de cebola
19	DFs 320	Não identificado	-	Folha de alho
20	DFs 326	Não identificado	-	Folha de cebola
21	DFs 347	Não identificado	-	Folha de cebola
22	DFs 348	*Bacillus cereus*	100%	Folha de cebola
23	DFs 349	Não identificado	-	Folha de cebola
24	DFs 359	Não identificado	-	Folha de cebola
25	DFs 381	Não identificado	-	Túnica de alho
26	DFs 409	Não identificado	-	Sementes de cebola
27	DFs 416	*Bacillus* sp.	-	Indicador de antibiose contra *Bipolaris oryzae*

Representação numérica	Tratamentos	Identificação*	Identidade**	Habitat
28	DFs 419	*Bacillus cereus*	99%	Indicador de antibiose contra *Bipolaris oryzae*
29	DFs 422	Não identificado	-	Indicador de antibiose contra *Bipolaris oryzae*
30	DFs 439	Não identificado	-	Bulbilho de alho
31	DFs 447	Não identificado	-	Folha de cebola
32	DFs 456	Não identificado	-	Folha de cebola
33	DFs 465	Não identificado	-	Túnica de alho
34	DFs 506	Não identificado	-	Túnica de cebola
35	DFs 513	*Pseudomonas veronii*	100%	Túnica de cebola
36	DFs 532	Não identificado	-	Folha de soja
37	DFs 567	Não identificado	-	Sementes de milho
38	DFs 582	Não identificado	-	-
39	DFs 583	Não identificado	-	-
40	DFs 592	*Bacillus subtilis*	99%	Sementes de milho
41	DFs 622	*Bacillus* sp.	-	Solo - alho (Capão do Leão/UFPel II)
42	DFs 628	*Bacillus subtilis*	98%	Solo - alho (Capão do Leão/UFPel II)
43	DFs 644	Não identificado	-	Solo - alho (Capão do Leão/UFPel II)
44	DFs 658	*Bacillus subtilis*	99%	Solo - alho (Capão do Leão/UFPel II)
45	DFs 755	Não identificado	-	Solo - feijão
46	DFs 756	Não identificado	-	Solo - feijão
47	DFs 769	*Bacillus cereus*	100%	Vagens de feijoeiro (Cascata/Pelotas II)
48	DFs 781	Não identificado	-	Solo - feijão (Cascata/Pelotas II)
49	DFs 808	Não identificado	-	Vagens de feijoeiro
50	DFs 831	Não identificado	-	Solo - feijão (Cascata/Pelotas II)
51	DFs 842	*Pseudomonas* sp.	-	Folhas de feijoeiro
52	DFs 859	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel III)
53	DFs 876	*Bacillus subtilis*	96%	Solo (Capão do Leão/UFPel III)
54	DFs 912	*Rhodococus fascians*	99%	Folhas de feijoeiro
55	DFs 929	Não identificado	-	Vagens de feijoeiro

Representação numérica	Tratamentos	Identificação*	Identidade**	Habitat
56	DFs 976	Não identificado	-	Sementes de feijão
57	DFs 1020	Não identificado	-	Solo (Arroio Grande)
58	DFs 1039	Não identificado	-	Solo (Cerrito)
59	DFs 1058	Não identificado	-	Solo - sem cultivo
60	DFs 1192	Não identificado	-	Solo
61	DFs 1219	Não identificado	-	Solo
62	DFs 1256	*Bacillus subtilis*	98%	Solo
63	DFs 1258	Não identificado	-	Sementes de arroz
64	DFs 1320	Não identificado	-	Indicador de antibiose contra *Bipolaris oryzae*
65	DFs 1341	*Bacillus subtilis*	99%	Solo (Pelotas IV)
66	DFs 1391	*Bacillus thuringiensis*	99%	Solo (Pelotas IV)
67	DFs 1414	*Bacillus* sp.	-	Rizosfera de tomate (Viçosa)
68	DFs 1420	*Bacillu*s pumilus	99%	Rizosfera de tomate (Viçosa)
69	DFs 1422	*Stenotrophomonas maltophilia*	99%	Rizosfera de tomate (Viçosa)
70	DFs 1442	Não identificado	-	Solo - sem cultivo (Capão do Leão/UFPel IV)
71	DFs 1458	Não identificado	-	Solo - sem cultivo (Capão do Leão/UFPel IV)
72	DFs 1484	Não identificado	-	Solo - sem cultivo (Capão do Leão/UFPel IV)
73	DFs 1486	*Bacillus* sp.	-	Solo - sem cultivo (Capão do Leão/UFPel IV)
74	DFs 1576	Não identificado	-	Sementes de arroz
75	DFs 1595	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel IV)
76	DFs 1608	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel IV)
77	DFs 1612	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel IV)
78	DFs 1613	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel IV)
79	DFs 1615	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel IV)
80	DFs 1625	Não identificado	-	Caule de picão preto
81	DFs 1632	Não identificado	-	Caule de picão preto
82	DFs 1810	Não identificado	-	Solo (Capão do Leão/UFPel IV)

Representação numérica	Tratamentos	Identificação*	Identidade**	Habitat
83	DFs 1895	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Embrapa I)
84	DFs 1985	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Ametista XIII)
85	DFs 2048	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Turmalina V)
86	DFs 2049	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Turmalina V)
87	DFs 2052	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Ametista XIV)
88	DFs 2108	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Turmalina VIII)
89	DFs 2121	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Turmalina IX)
90	DFs 2137	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Turmalina VIII)
91	DFs 2147	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Turmalina VIII)
92	DFs 2162	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Turmalina VI)
93	DFs 2172	Não identificado	-	Solo - pessegueiro (Turmalina VIII)
94	DFs 2273	Não identificado	-	Indicador de antibiose contra *Monilinia* sp.
95	DFs 2282	Não identificado	-	Vermicomposto de esterco bovino
96	DFs 2296	Não identificado	-	Vermicomposto de esterco bovino

* Identificados por sequenciamento do gene 16S rDNA (dados não publicados)
** Percentual de homologia das sequências correspondentes ao gene 16S rDNA dos isolados bacterianos e das sequências das respectivas espécies registradas em banco de dados.

Para o preparo das suspensões bacterianas, os isolados foram cultivados, separadamente, em tubos de ensaio contendo o meio 523 de Kado e Heskett (1970). Após 24 horas de crescimento, as colônias obtidas foram suspensas em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) (Figura 1A) cuja concentração foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540} = 0,5$.

No procedimento de microbiolização, 30 sementes de canola foram imersas nas suspensões de cada isolado bacteriano durante quatro horas sob agitação constante e temperatura de 25 ± 1^{o}C (Figura 1B e 1C). As sementes correspondentes ao tratamento testemunha foram imersas somente em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%).

A semeadura foi realizada em casa de vegetação no dia 01 de junho de 2012. As sementes de cada tratamento foram divididas em cinco repetições de seis unidades cada, as quais foram distribuídas em copos plásticos com capacidade de

0,5 L, contendo mistura de solo e areia não esterilizados na proporção 2:1 (Figura 1D).

A irrigação foi realizada diariamente acrescentando-se a quantidade de água necessária para umedecer totalmente o substrato. Após a emergência, foi realizado o desbaste, permanecendo apenas uma planta em cada vaso.

Aos 55 dias após a semeadura [DAS] (estádio de roseta com três/quatro folhas completamente expandidas) efetuaram-se as determinações da fluorescência da clorofila *a* e a coleta das plantas para avaliação da área foliar e da massa seca da parte aérea.

A fluorescência transiente polifásica (OJIP) da clorofila *a* foi registrada nas primeiras folhas jovens completamente expandidas, utilizando-se um fluorômetro portátil (Modelo Handy PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK). As medidas foram realizadas no período da manhã, entre 8 e 10 horas, em folhas previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons.

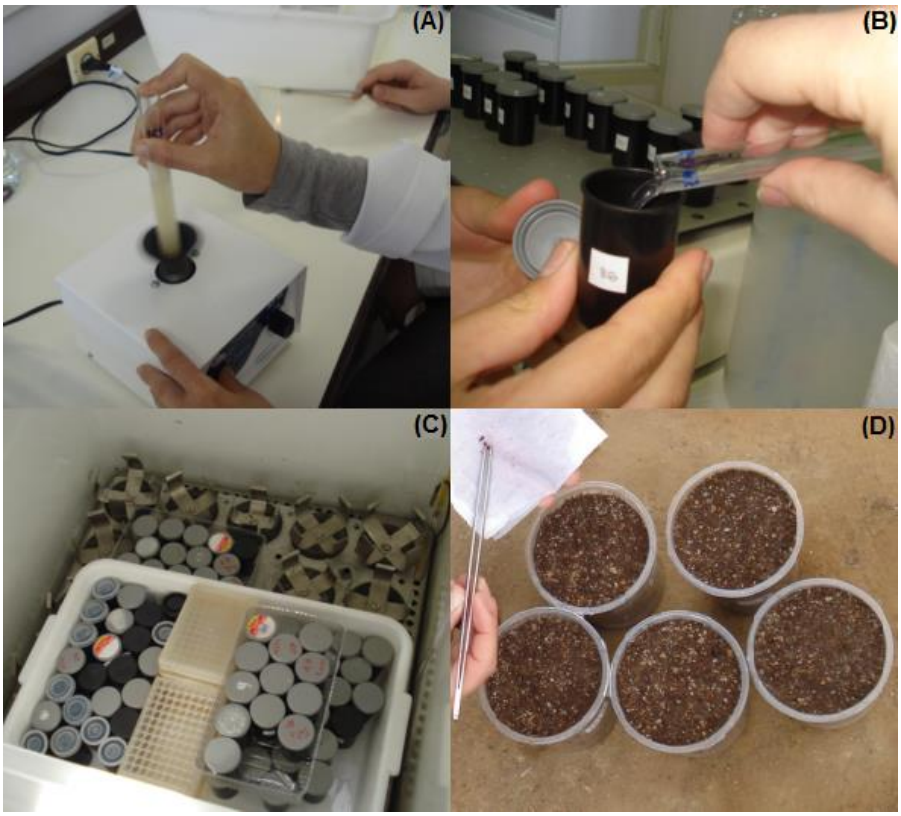

Figura 1. Procedimentos realizados na instalação do experimento de seleção massal de isolados bacterianos: (A) suspensão das colônias de bactérias em solução salina; (B) imersão das sementes nas suspensões bacterianas; (C) agitação das sementes e suspensões; (D) semeadura.

A emissão de fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro, a partir da aplicação de um pulso de luz saturante numa intensidade de 3000 μmol m^{-2} s^{-1}. As intensidades de fluorescência a 50, 100, 300 μs, 2 (F_J) e 30 (F_I) ms e F_M (fluorescência máxima) foram utilizadas para os cálculos dos parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER & STRASSER, 1995).

A área foliar foi avaliada utilizando-se um medidor de área foliar (Modelo LI-3100, Li-Cor Inc., Lincoln, NE). A massa seca foi obtida pela pesagem do material vegetal, após secagem em estufa com circulação de ar forçada, a 70^{o}C por um período de pelo menos 72h até obtenção da massa constante.

As variáveis de crescimento e os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* avaliados neste ensaio são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis analisadas em experimento de seleção massal de bactérias promotoras do crescimento em plantas do híbrido de canola Hyola 433 aos 55 dias após a semeadura

Variável	Descrição	Unidade
MSPA	Massa seca da parte aérea	g $planta^{-1}$
AF	Área foliar	cm^2 $planta^{-1}$
F_0/F_M	Relação entre a fluorescência inicial e a fluorescência máxima	u.a.*
F_V/F_0	Relação entre a fluorescência variável e a fluorescência inicial	u.a.*
ABS/RC	Fluxo de absorção por centro de reação	u.a.*
TR_0/RC	Fluxo de captura de energia por centro de reação	u.a.*
ET_0/RC	Fluxo de transporte de elétrons por centro de reação	u.a.*
RE_0/RC	Fluxo de redução dos aceptores de elétrons finais do lado aceptor do FSI por centro de reação.	u.a.*
φ_{Po}	Rendimento quântico máximo fotoquímico primário	u.a.*
φ_{Eo}	Rendimento quântico para o transporte de elétrons	u.a.*
φ_{Ro}	Rendimento quântico para redução dos aceptores de elétrons do lado aceptor do FSI	u.a.*
Ψ_{Eo}	Eficiência/probabilidade que um elétron se mova além de Q_A	u.a.*
δ_{Ro}	Eficiência/probabilidade que um elétron do intersistema de carreadores de elétrons se mova para reduzir os aceptores de elétrons finais no lado aceptor do FSI	u.a.*
PI_{abs}	Índice de performance para a conservação de energia de excitação na redução dos aceptores de elétrons do intersistema	u.a.*
PI_{total}	Índice de performance para a conservação de energia de excitação na redução dos aceptores finais do FSI	u.a.*

*u.a.: unidade absoluta.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento em ambas as avaliações, onde a unidade experimental foi constituída por um vaso contendo uma planta.

Inicialmente, com as medidas registradas dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* de interesse, foram construídos diagramas de dispersão dos dados com intervalos de confiança de 95% e estimados os coeficientes de correlação de Pearson (r) para estabelecer o grau de associação entre estas variáveis e os parâmetros de crescimento.

Por meio dos resultados obtidos, foram selecionados como parâmetros de fluorescência mais responsivos os que apresentaram maior grau de associação linear com as variáveis de crescimento (área foliar e massa seca total da parte aérea). Após a avaliação da correlação, os dados de todas variáveis selecionadas foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

3.2. Ensaio II

3.2.1. Etapa I: Fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e crescimento de plantas do híbrido de canola Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos

Os isolados bacterianos utilizados nesta etapa (DFs 119, DFs 144, DFs 149, DFs 320, DFs 359, DFs 439, DFs 465 e DFs 628) foram selecionados através do ensaio inicial em função do desempenho superior à testemunha, em pelo menos dois dos parâmetros relacionados ao crescimento e ao índice de performance. Além dos isolados que apresentaram efeitos positivos, foram incluídos três isolados (DFs 104, DFs 513 e DFs 2282) cujos parâmetros utilizados para seleção foram semelhantes aos da testemunha com o objetivo de verificar possíveis alterações do comportamento destes ao longo do ciclo da planta. Devido ao fato de não apresentar crescimento no meio de cultura, o isolado DFs 185 não pode fazer parte do conjunto de tratamentos.

Os dados meteorológicos de temperaturas mínima, máxima e média diária, insolação, radiação solar e número de dias de geada do período correspondente à realização do ensaio foram coletados na Estação Agroclimatológica de Pelotas -

Convênio EMBRAPA/UFPEL, localizada a aproximadamente 1000 metros da casa de vegetação onde foi desenvolvido o estudo, e são apresentados no Anexo B.

Os procedimentos de cultivo das bactérias, preparo das suspensões e microbiolização das sementes seguiram a mesma metodologia empregada no Ensaio I (item 3.1.).

Procedeu-se a microbiolização de 80 sementes do híbrido de canola Hyola 433 com cada um dos isolados bacterianos. Posteriormente, realizou-se a semeadura, no dia 14 de agosto de 2012, onde oito sementes foram distribuídas em cada vaso plástico (capacidade de 3 L) contendo mistura de solo e areia não esterilizados na proporção 2:1, totalizando dez repetições para cada tratamento.

Os vasos foram acondicionados em casa de vegetação e a irrigação foi realizada diariamente umedecendo totalmente o substrato. Após a emergência, foi feito o desbaste, permanecendo apenas uma planta em cada vaso.

Avaliações da fluorescência da clorofila *a* e das trocas gasosas foram efetuadas aos 42 DAS (estádio de roseta com três/quatro folhas completamente expandidas), 58 DAS (estádio de roseta com quatro/cinco folhas completamente expandidas) e 70 DAS (início da floração - botões florais presentes e envoltos por folhas). Ao final do experimento, onde os botões florais apresentavam-se visíveis de cima (77 DAS), procedeu-se a coleta de todas as plantas para determinação da massa seca da parte aérea.

A fluorescência transiente da clorofila *a*, registrada em 10 repetições em cada avaliação, e a massa seca da parte aérea foram determinadas conforme a metodologia descrita no Ensaio I (item 3.1.).

As trocas gasosas foram medidas em folhas jovens, completamente expandidas. As leituras foram realizadas em cinco plantas por tratamento em cada avaliação, entre 10:00 e 11:30h. Foi utilizado um analisador de gases a infravermelho (modelo LI-6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) com concentração de CO_2 na câmara de 380 µmol mol^{-1} e densidade de fluxo de fótons de 1200 µmol m^{-2} s^{-1}, utilizando-se a fonte luminosa LI-COR 6400-02 acoplada a câmara de medida (modelo LI-COR 6400-11). As variáveis analisadas foram: taxa líquida de assimilação de CO_2 (A, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (g_s, mol H_2O m^{-2} s^{-1}) e concentração intercelular de CO_2 (C_i, µmol CO_2 mol^{-1}).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado onde a unidade experimental foi constituída por um vaso contendo uma planta. Os dados

coletados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

3.2.2. Etapa II: Emergência, fluorescência da clorofila *a* e crescimento de plantas do híbrido de canola Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos

O mesmo conjunto de isolados bacterianos correspondente ao item 3.2.1. (DFs 104, DFs 119, DFs 144, DFs 149, DFs 320, DFs 359, DFs 439, DFs 465, DFs 513, DFs 628 e DFs 2282) foi utilizado para a microbiolização de sementes do híbrido de canola Hyola 61.

Os dados meteorológicos de temperaturas mínima, máxima e média diária, insolação, radiação solar e número de dias de geada do período correspondente à realização do ensaio foram coletados na Estação Agroclimatológica de Pelotas - Convênio EMBRAPA/UFPEL, localizada a aproximadamente 1000 metros da casa de vegetação onde foi realizado o estudo e são apresentados no Anexo C.

Os dados meteorológicos de temperaturas mínima, máxima e média diária, insolação, radiação solar e número de dias de geada do período correspondente à realização do ensaio foram coletados na Estação Agroclimatológica de Pelotas - Convênio EMBRAPA/UFPEL, localizada a aproximadamente 1000 metros da casa de vegetação onde foi desenvolvido o estudo, e são apresentados no Anexo C.

Os procedimentos de cultivo das bactérias, preparo das suspensões e o processo de microbiolização das sementes seguiram a mesma metodologia empregada no Ensaio I (item 3.1.1).

Realizou-se a imersão de 45 sementes nas suspensões de cada isolado bacteriano bem como em solução salina esterilizada (testemunha). A semeadura ocorreu em casa de vegetação, no dia 20 de março de 2013, em vasos plásticos (capacidade de 3 L) contendo mistura de solo e areia não esterilizados na proporção 2:1, onde as sementes de cada tratamento foram divididas em nove repetições de cinco unidades cada. A irrigação foi realizada diariamente umedecendo totalmente o substrato.

Aos 21 DAS (folhas cotiledonares completamente expandidas) foi feita a contagem das plântulas emergidas em todos os vasos, sendo calculada a variável

emergência expressa em percentagem. Após obtenção dos valores de emergência foi realizado o desbaste, permanecendo apenas uma planta em cada vaso.

Efetuou-se a avaliação da fluorescência transiente aos 41 DAS (estádio de roseta com três/quatro folhas completamente expandidas), assim como a coleta de todas as plantas para determinação da área foliar, massa seca das folhas e massa seca dos pecíolos e caules.

A fluorescência transiente da clorofila *a* e a massa seca das partes da planta foram registradas em nove repetições e determinadas conforme a metodologia descrita no Ensaio I (item 3.1.1).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado onde a unidade experimental foi constituída por um vaso contendo uma planta. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

3.3. Ensaio III - Emergência, fluorescência da clorofila *a*, crescimento e produção de plantas do híbrido de canola Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos

Os isolados utilizados neste ensaio (DFs 104, DFs 320, DFs 513 e DFs 628) foram selecionados a partir dos resultados obtidos nos Ensaios I e II. Além dos isolados com comportamento superior nos parâmetros área foliar e massa seca das folhas e da parte aérea, foi incluído ao conjunto de tratamentos DFs 104, o qual apresentou resposta similar a da testemunha.

Os dados meteorológicos das temperaturas mínima, máxima e média diária, insolação, radiação solar e dias de geada foram coletados na Estação Agroclimatológica de Pelotas - Convênio EMBRAPA/UFPEL, localizada a aproximadamente 1000 metros da casa de vegetação onde foi desenvolvido o estudo, e organizados em períodos antecedentes às coletas (Anexo D).

O cultivo dos isolados bacterianos, preparo das suspensões e o procedimento de microbiolização das sementes seguiram a mesma metodologia empregada no Ensaio I (item 3.1.1).

Lotes de 200 sementes do híbrido de canola Hyola 61 foram utilizados para a microbiolização com cada um dos isolados bacterianos. Posteriormente, realizou-se a semeadura no dia 08 de maio de 2013, onde cinco sementes foram distribuídas

por vaso plástico (capacidade de 3 L) contendo mistura de solo e areia não esterilizados na proporção 2:1. A irrigação foi realizada diariamente umedecendo totalmente o substrato.

A emergência das plântulas foi determinada aos 21 DAS (folhas cotiledonares completamente expandidas), através da contagem das plântulas emergidas em dez vasos e expressa em percentagem. Após obtenção dos valores de emergência foi realizado o desbaste, permanecendo apenas uma planta em cada vaso.

As avaliações da fluorescência da clorofila *a* e do índice de clorofila tiveram início aos 35 DAS (estádio de roseta com duas folhas completamente expandidas) e foram repetidas em intervalos de aproximadamente 14 dias até 146 DAS (plantas com mais de 50% das síliquas em tamanho final). Juntamente com estas avaliações foram coletadas as plantas para obtenção dos parâmetros de crescimento (área foliar e massa seca das partes das plantas).

A fluorescência transiente OJIP foi medida de acordo com a metodologia descrita no Ensaio I (item 3.1.1) utilizando-se dez repetições, enquanto que a área foliar, a massa seca das folhas, caule e pecíolos, folhas senescentes, inflorescências e síliquas foram avaliadas em quatro repetições por coleta.

Os teores de clorofila foram estimados nas folhas selecionadas para as determinações dos parâmetros de fluorescência utilizando-se um medidor portátil de clorofila CL-01 (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK) e expressos em índice de clorofila, conforme descrito por Cassol et al. (2008).

Ao final do experimento, aos 168 DAS (maturação - 50% dos grãos do caule principal com coloração marrom ou preta), foram determinados, além da massa seca das partes da planta, os componentes de produção. Para tanto, coletaram-se as síliquas juntamente com os grãos de cinco plantas, sendo estas acondicionadas durante sete dias a temperatura de 26 ± 2^{o}C, antes de compor a média dos seguintes caracteres: número de síliquas planta^{-1}; número de grãos planta^{-1}; massa fresca dos grãos planta^{-1}; número de grãos síliqua^{-1}; e massa fresca de 1000 grãos.

A partir dos grãos coletados, procedeu-se a extração de lipídios para determinação da composição dos ácidos graxos. A extração e transmetilação dos ácidos graxos foi realizada pelo método direto (BROWSE et al., 1986), a partir de amostras constituídas de 100 mg de massa seca de grãos. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio com tampa de rosca com teflon, sendo adicionados em seguida 2 mL de solução de metanol:H_2SO_4 (2,5% v/v). Após permanência por

uma hora em banho maria (70^{o}C), os tubos foram colocados para resfriar em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de solução de NaCl (1%) e 2 mL de hexano, para a separação das fases.

A alíquota da fase hexano (que continha os ácidos graxos metilados - FAME) foi coletada com auxilio de uma pipeta de Pasteur. A partir desta fase os FAME foram analisados em Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GC-2010 Plus, equipado com injetor automático, detector por ionização de chama (FID) e coluna capilar Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm diâmetro interno, 0,25 µm espessura de filme). Os parâmetros de operação foram: temperatura do detector, 250ºC; temperatura do injetor, 240ºC; temperatura da coluna inicial de 100ºC, de 100 para 190ºC a 20ºC/min e para 230ºC a 4ºC/min, com tempo de manutenção de 10 min. Os picos de interesse dos ácidos graxos [ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); ácido oleico (C18:1); ácido linoleico (C18:2); e ácido linolênico (C18:3)] foram comparados com os tempos de retenção de padrão conhecido (FAME Mix GCL 10, Sulpeco-Sigma) e quantificados a partir de curva padrão. Os valores foram expressos em percentagem deste FAME na amostra.

O delineamento do experimento foi o inteiramente casualizado onde a unidade experimental foi constituída por um vaso contendo uma planta. Para análise dos resultados calcularam-se os erros padrão das médias. Além disso, os dados de produção e de composição de ácidos graxos dos grãos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio I

Na Tabela 3 são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson e o nível de significância dos parâmetros analisados, obtidos a partir dos dados de todos os tratamentos.

Observa-se alta correlação entre a massa seca da parte aérea e a área foliar (r = 0,90) (Tabela 3). Para os demais parâmetros, os coeficientes de correlação não foram elevados. Admitindo as observações de Dancey e Reidy (2005), pode-se

inferir que tais valores apresentaram correlações classificadas como fracas. Porém, Figueiredo Filho e Silva Júnior (2009) citam que a utilização dos coeficientes de correlação de Pearson de forma isolada pode gerar interpretação equivocada, sugerindo a complementação com gráficos de dispersão entre as variáveis analisadas. Assim, optou-se pela análise de dispersão dos parâmetros com níveis de $p < 0,05$, mesmo apresentando coeficientes de correlação de Pearson fracos. Tal procedimento foi necessário em face da grande quantidade de parâmetros obtidos a partir do Teste JIP, podendo, desta forma, estabelecer os mais representativos para a seleção dos isolados.

Os parâmetros F_0/F_M, F_V/F_0, ABS/RC, TR_0/RC, φ_{Po}, PI_{abs} e PI_{total}, cujos diagramas de dispersão em relação a área foliar e a massa seca da parte aérea são apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente, tiveram o maior grau de correlação com as variáveis de crescimento, dentre os demais parâmetros estudados, sendo portanto selecionados como variáveis de interesse neste estudo.

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson e nível de significância entre os parâmetros avaliados em plantas de canola do híbrido Hyola 433, originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos aos 55 dias após a semeadura [n = 485]

Parâmetros	Aérea foliar	Massa seca da parte aérea
Massa seca da parte aérea*	0,90 (0,0000)	
F_0/F_M*	-0,15 (0,0018)	-0,12 (0,0111)
F_V/F_0*	0,16 (0,0011)	0,13 (0,0081)
ABS/RC*	-0,19 (0,0001)	-0,23 (0,0001)
TR_0/RC*	-0,18 (0,0001)	-0,25 (0,0002)
ET_0/RC	-0,09 (0,0593)	-0,14 (0,0055)
RE_0/RC	-0,06 (0,2173)	-0,16 (0,0015)
φ_{Po}*	0,15 (0,0018)	0,12 (0,0112)
φ_{Eo}	0,09 (0,0517)	0,09 (0,0721)
φ_{Ro}	0,10 (0,0261)	0,04 (0,3922)
Ψ_{Eo}	0,06 (0,2222)	0,06 (0,2185)
δ_{Ro}	0,05 (0,3249)	-0,03 (0,5353)
PI_{abs}*	0,17 (0,0003)	0,18 (0,0002)
PI_{total}*	0,17 (0,0004)	0,12 (0,0112)

* Parâmetros de maior correlação com as variáveis de crescimento e especificamente com a área foliar no caso da massa seca da parte aérea.

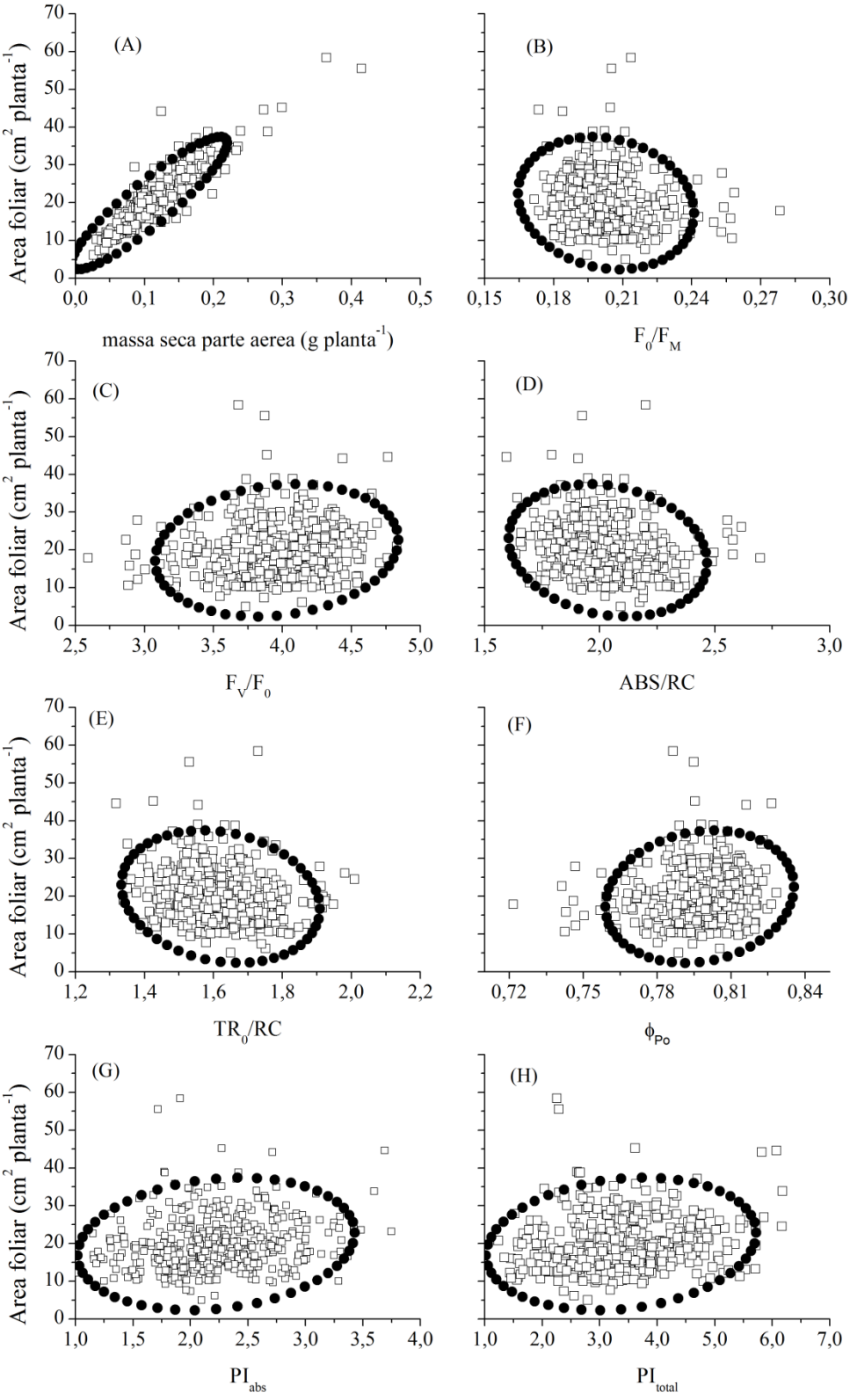

Figura 2. Diagramas de dispersão da massa seca da parte aérea, g planta^{-1}, e de parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, unidade absoluta, versus área foliar, cm^2 planta^{-1}, de plantas de canola híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtidos aos 55 dias após a semeadura. As elipses marcadas com linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

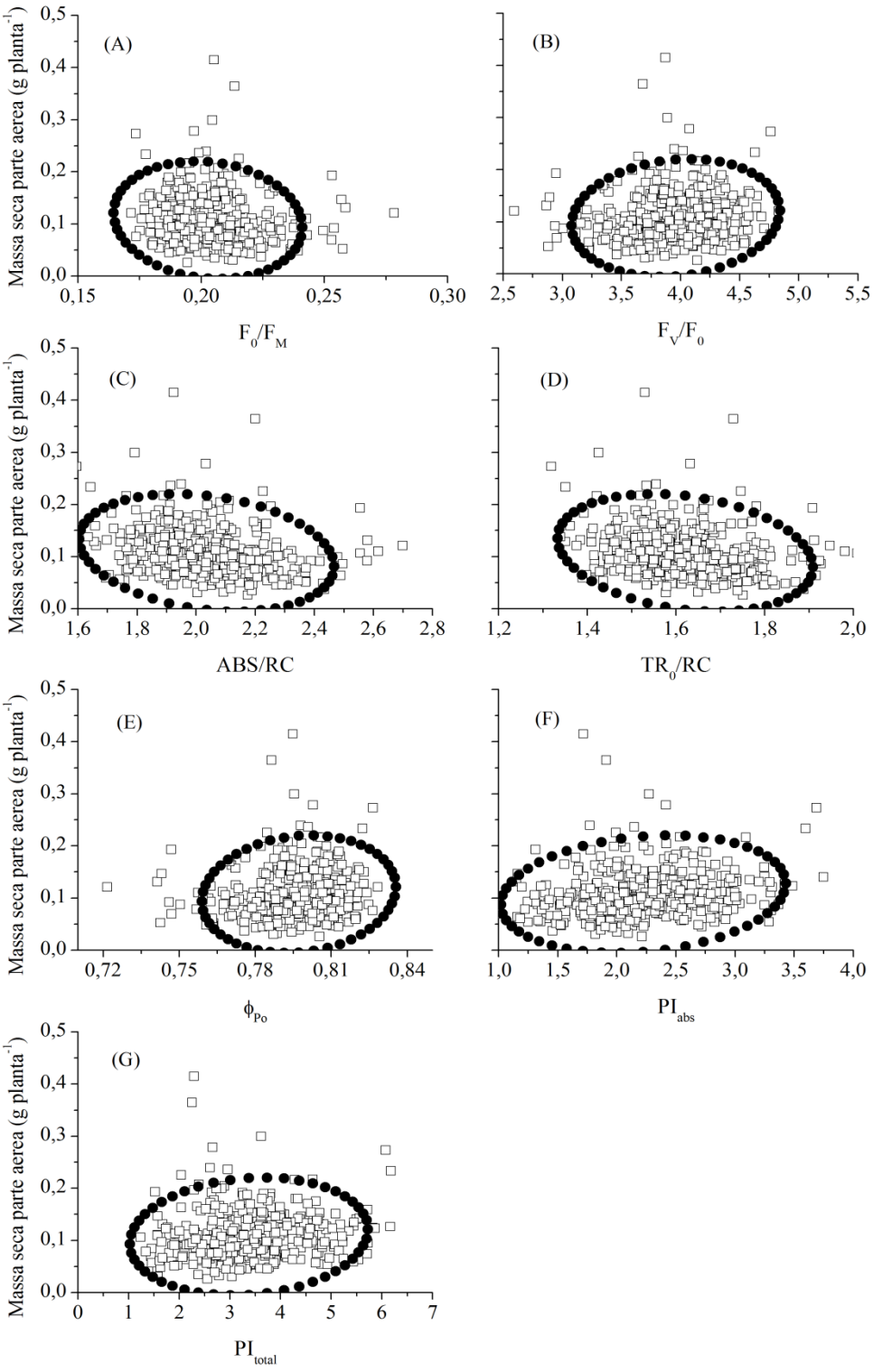

Figura 3. Diagramas de dispersão de parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, unidade absoluta, versus massa seca da parte aérea, g planta^{-1}, de plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com isolados bacterianos obtidos aos 55 dias após a semeadura. As elipses marcadas com linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Para os parâmetros de crescimento verificaram-se diferentes respostas das plantas aos tratamentos (Figura 4). Em relação à área foliar pode-se destacar: a) um grupo de três isolados [11 (DFs 144), 16 (DFs 185) e 42 (DFs 628)] superiores aos demais tratamentos, apresentando valores aproximadamente 140, 120 e 90% maiores que os encontrados na testemunha (Figura 4A); b) um segundo grupo que também diferiu da testemunha com 28 isolados [2, 5, 8, 9, 12, 15, 18, 21, 22, 23, 24, 29, 36, 43, 52, 62, 64, 66, 72, 74, 77, 80, 84, 86, 87, 88, 92 e 93], com valores de incremento de 32 a 74%; c) e um terceiro grupo com os demais tratamentos que não diferiram da testemunha, onde se evidencia os isolados DFs 104 (6), DFs 447 (31), DFs 1219 (61) e DFs 145 (71) com as maiores reduções na área foliar (21 a 36%).

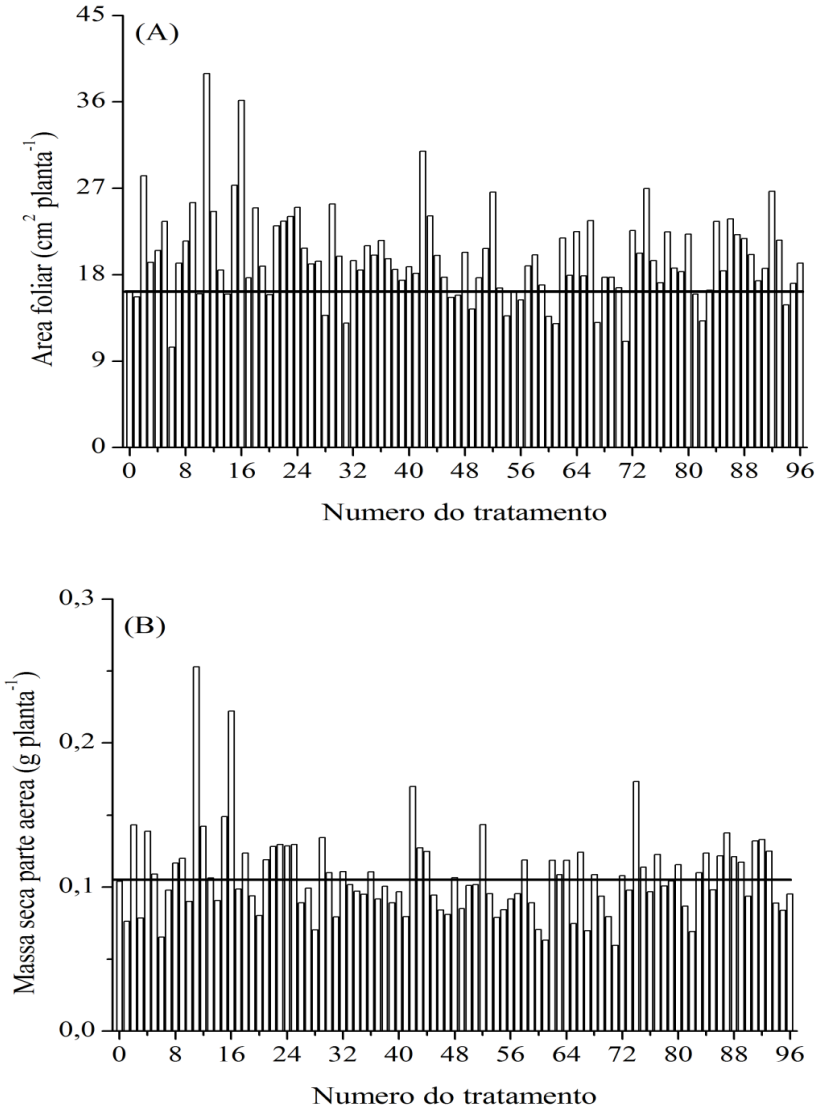

Figura 4. Área foliar, cm^2 planta^{-1}, (A) e massa seca da parte aérea, g planta^{-1}, (B) de plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtidas aos 55 dias após a semeadura. As linhas na horizontal destacam o valor médio de cada variável apresentado pela testemunha.

Para a massa seca da parte aérea verificou-se: a) incrementos de aproximadamente 140% no tratamento 11 (DFs 144) e 110% no tratamento 16 (DFs 185) (Figura 4B) em relação à testemunha; b) um segundo grupo de isolados que também apresentou valores superiores aos da testemunha, variando de 11% a 67%, com 32 tratamentos [2, 4, 8, 9, 12, 15, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 42, 43, 44, 52, 58, 62, 64, 66, 74, 77, 80, 84, 86, 87, 88, 89, 91, 92 e 93]; c) e um terceiro grupo com os tratamentos que não diferiram da testemunha onde se evidenciam DFs 104 (6), DFs 419 (28), DFs 1192 (60), DFs 1219 (61), DFs 1414 (67), DFs 145 (71) e DFs 1810 (82) com as maiores reduções na massa seca da parte aérea (32 a 43%).

Na Figura 5 observa-se a variação dos parâmetros do Teste JIP em função dos diferentes tratamentos. Em relação aos parâmetros F_0/F_M e F_V/F_0 (Figura 5A e 5B) verificou-se que a maioria dos isolados apresentou valores semelhantes aos da testemunha. O parâmetro F_0/F_M indica o rendimento quântico basal do processo não fotoquímico no FSII e é representado pela fórmula $F_0/F_M = \varphi_{Fo} + \varphi_{Do}$, onde φ_{Fo} é o rendimento quântico mínimo e φ_{Do} o rendimento quântico de dissipação térmica no FSII, ambos no estado adaptado ao escuro (ROHÁCEK & BARTÁK, 1999). Vários autores têm identificado que o aumento de F_0/F_M pode estar relacionado com situações de estresses, e têm sugerido uma faixa de valores, variando de 0,14 a 0,20, que pode ser considerada como padrão em condições normais de crescimento (ROHÁCEK, 2002).

Para a relação F_V/F_0, que indica a relação máxima do rendimento quântico dos processos concorrentes fotoquímicos e não fotoquímicos no FSII, a faixa de valores considerada normal é de 4 a 6, evidenciando que no estado adaptado ao escuro $F_V = 5\ F_0$ (ROHÁCEK, 2002).

No presente estudo, parte dos tratamentos apresentaram valores de F_0/F_M superiores a 0,20 e valores de F_V/F_0 menores que 4 indicando possíveis efeitos sobre o rendimento quântico basal não fotoquímico e a eficiência máxima fotoquímica nas folhas. Os isolados que promoveram estas diferenças de forma mais acentuada foram DFs 96 (5), DFs 149 (12), DFs 1615 (79), DFs 2121 (89) e DFs 2282 (95).

Embora F_0/F_M e F_V/F_0 estejam diretamente relacionados com rendimento quântico máximo da fotoquímica primária (φ_{Po}) e tenham diferido da testemunha em função do procedimento de microbiolização, não foram observadas diferenças estatísticas dos valores de φ_{Po} (Figura 5E).

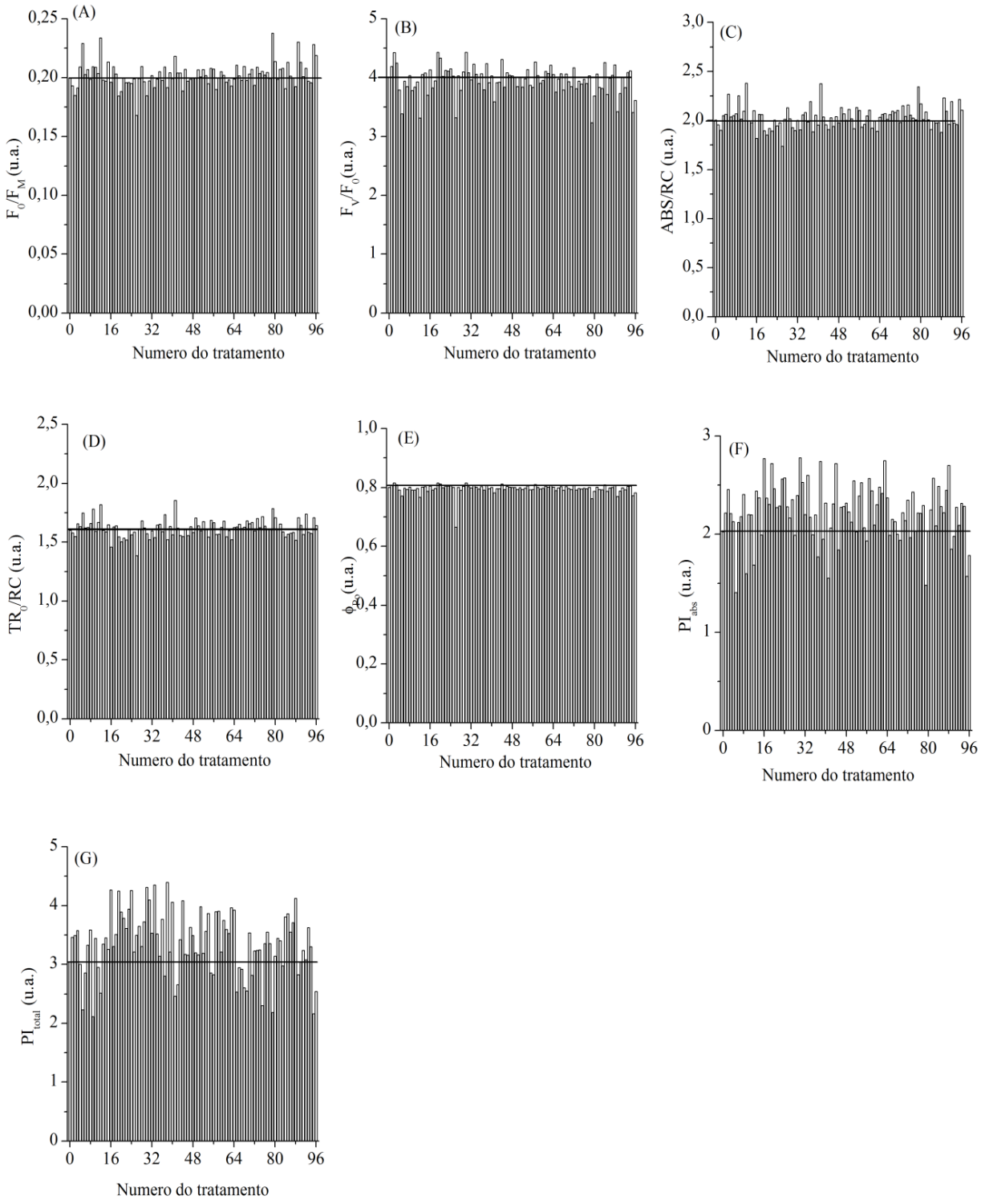

Figura 5. Parâmetros do Teste JIP, unidade absoluta - u.a., de plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtidos aos 55 dias após a semeadura. As linhas na horizontal destacam o valor médio de cada variável apresentado pela testemunha.

Em relação aos parâmetros que descrevem fluxos específicos por centro de reação (RC), aproximadamente 43% dos isolados promoveram aumento do fluxo de absorção por RC (ABS/RC) (Figura 5C) e em torno de 35% no fluxo de energia capturado por RC (TR_0/RC) (Figura 5D). Cabe salientar que todos os isolados que aumentaram o fluxo de energia de excitação capturada do sistema antena do FSII para o RC também apresentaram incrementos da absorção de energia pelas clorofilas do sistema coletor de luz.

Os índices de performance PI_{abs} e $PI_{total,}$ que descreve a operação em série dos dois fotossistemas por meio do comportamento dos parâmetros estruturais do FSII até os aceptores finais de elétrons do FSI, variaram em função do isolado utilizado na microbiolização das sementes. Dentre os isolados avaliados, 65% promoveram aumento nos valores de PI_{abs} e 55% nos valores de PI_{total} (Figura 5F e 5G).

Com base nas respostas obtidas em relação ao crescimento e performance do aparato fotossintético das plantas de canola em função dos tratamentos de microbiolização das sementes foram selecionados 12 dos 96 isolados bacterianos para a segunda etapa de avaliação, os quais são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Isolados bacterianos escolhidos para segunda etapa de avaliação e comportamento dos parâmetros utilizados no procedimento de seleção

Representação numérica[1]	Isolado	Parâmetros superiores aos apresentados pela testemunha
6	DFs 104	(*)
9	DFs 119	Parâmetros de crescimento
11	DFs 144	Parâmetros de crescimento e índices de performance
12	DFs 149	Parâmetros de crescimento
16	DFs 185	Parâmetros de crescimento e índices de performance
19	DFs 320	Índices de performance
24	DFs 359	Parâmetros de crescimento e índices de performance
30	DFs 439	Índices de performance
33	DFs 465	Índices de performance
35	DFs 513	(*)
42	DFs 628	Parâmetros de crescimento
95	DFs 2282	(*)

[1] A representação numérica diz respeito a ordem dos isolados determinada na Tabela 1.
(*) Comportamento dos parâmetros semelhante ao da testemunha.

4.2. Ensaio II

4.2.1. Etapa I

Os tratamentos promoveram alterações no funcionamento do aparato fotossintético das folhas de plantas de canola, as quais são identificadas através dos parâmetros do Teste JIP (Tabela 5, 8 e 9).

Na primeira avaliação, aos 42 DAS, a relação máxima do rendimento quântico dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos no FSII (F_V/F_0) aumentou em relação à testemunha em sete dos tratamentos avaliados, sendo a maior média correspondente ao isolado DFs 628 (Tabela 5).

Quanto aos fluxos específicos por RC, apenas os fluxos de transporte de elétrons (ET_0/RC) e de redução dos aceptores de elétrons finais do lado aceptor do FSI (RE_0/RC) foram reduzidos em função da microbiolização com alguns dos isolados (DFs 104, DFs 144, DFs 149, DFs 320 e DFs 2282). Os fluxos de absorção (ABS/RC) e captura de energia (TR_0/RC) não diferiram estatisticamente da testemunha.

Tabela 5. Parâmetros do Teste JIP obtidos a partir da determinação de fluorescência da clorofila em plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos aos 42 dias após a semeadura

Tratamentos	Parâmetros do Teste JIP									
	F_V/F_0	ABS/RC	TR_0/RC	ET_0/RC	RE_0/RC	φ_{Po}	φ_{Eo}	φ_{Ro}	Ψ_{Eo}	δ_{Ro}
Testemunha	4,107 b	2,269$^{(ns)}$	1,822$^{(ns)}$	1,129 a	0,608 a	0,804 b	0,499 a	0,268$^{(ns)}$	0,620 a	0,538$^{(ns)}$
DFs 104	4,283 a	2,170	1,758	1,022 b	0,531 b	0,811 a	0,471 b	0,245	0,581 b	0,520
DFs 119	4,218 a	2,213	1,788	1,074 a	0,559 a	0,808 a	0,486 b	0,254	0,601 b	0,521
DFs 144	4,125 b	2,211	1,777	1,038 b	0,521 b	0,804 b	0,472 b	0,237	0,586 b	0,502
DFs 149	4,338 a	2,125	1,726	1,026 b	0,519 b	0,812 a	0,483 b	0,244	0,594 b	0,505
DFs 320	4,330 a	2,171	1,761	1,047 b	0,532 b	0,812 a	0,483 b	0,245	0,594 b	0,509
DFs 359	4,268 a	2,170	1,756	1,079 a	0,561 a	0,810 a	0,498 a	0,258	0,614 a	0,519
DFs 439	4,196 a	2,254	1,817	1,084 a	0,569 a	0,807 b	0,481 b	0,252	0,596 b	0,523
DFs 465	4,042 b	2,207	1,766	1,071 a	0,581 a	0,801 b	0,486 b	0,264	0,607 a	0,542
DFs 513	4,027 b	2,263	1,811	1,058 a	0,575 a	0,801 b	0,468 b	0,255	0,585 b	0,542
DFs 628	4,402 a	2,124	1,730	1,069 a	0,547 b	0,815 a	0,503 a	0,257	0,618 a	0,511
DFs 2282	4,103 b	2,117	1,702	1,003 b	0,525 b	0,804 b	0,474 b	0,248	0,590 b	0,522

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$).
$^{(ns)}$ não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Em relação aos parâmetros que descrevem razões de fluxos, os mesmos isolados que favoreceram F_V/F_0, com exceção de DFs 439, promoveram o aumento do rendimento quântico máximo fotoquímico primário (φ_{Po}). O rendimento quântico para o transporte de elétrons (φ_{Eo}), assim como a eficiência/probabilidade que um elétron se mova além de Q_A (Ψ_{Eo}) foram reduzidos na maioria dos tratamentos, exceto aos correspondentes aos isolados DFs 359 e DFs 628 os quais não diferiram estatisticamente da testemunha.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos nos parâmetros rendimento quântico para redução dos aceptores de elétrons do lado aceptor do FSI (φ_{Ro}) e eficiência/probabilidade que um elétron do intersistema de carreadores de elétrons se mova para reduzir os aceptores de elétrons finais no lado aceptor (δ_{Ro}).

Com o decorrer do experimento, aos 58 DAS, os valores de F_V/F_0 foram reduzidos, em relação à testemunha, em todos os tratamentos (Tabela 6). Os tratamentos com os isolados DFs 144, DFs 149, DFs 359 e DFs 465 promoveram aumento em ABS/RC e TR_0/RC. Além disso, a maioria dos isolados, com exceção de DFs 359 e DFs 628, também aumentaram os valores de ET_0/RC. Todavia, embora observados incrementos nos fluxos de absorção, captura e transporte por RC, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos no que diz respeito aos fluxos de redução por RC (RE_0/RC).

O parâmetro φ_{Po} também não foi influenciado em função da microbiolização das sementes. Em relação às alterações verificadas nas razões de fluxos, observou-se que os isolados DFs 144, DFs 359, DFs 465 e DFs 628 reduziram os valores de φ_{Eo} sem modificar Ψ_{Eo} ao contrário dos demais isolados, cuja eficiência/probabilidade que um elétron se mova além de Q_A apresentou-se superior à testemunha. Quanto a φ_{Ro} e δ_{Ro}, ambos os parâmetros foram reduzidos em função dos tratamentos referentes a DFs 144, DFs 149, DFs 465, DFs 513 e DFs 2282, sendo que, em contrapartida, DFs 628 foi o único isolado onde verificou-se δ_{Ro} superior a testemunha.

Tabela 6. Parâmetros do Teste JIP obtidos a partir da determinação de fluorescência da clorofila em plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos aos 58 dias após a semeadura

Tratamento	Parâmetros do Teste JIP									
	F_V/F_0	ABS/RC	TR_0/RC	ET_0/RC	RE_0/RC	φ_{Po}	φ_{Eo}	φ_{Ro}	Ψ_{Eo}	δ_{Ro}
Testemunha	4,635 a	2,059 b	1,693 b	1,044 b	0,465$^{(ns)}$	0,823$^{(ns)}$	0,508 a	0,227 a	0,617 b	0,447 b
DFs 104	(*)									
DFs 119	4,434 b	2,120 b	1,729 b	1,101 a	0,486	0,816	0,520 a	0,229 a	0,637 a	0,440 c
DFs 144	4,259 b	2,311 a	1,871 a	1,151 a	0,483	0,810	0,499 b	0,210 b	0,617 b	0,420 c
DFs 149	4,358 b	2,264 a	1,840 a	1,148 a	0,489	0,813	0,507 a	0,217 b	0,624 a	0,427 c
DFs 320	4,486 b	2,092 b	1,709 b	1,106 a	0,505	0,818	0,529 a	0,241 a	0,647 a	0,455 b
DFs 359	4,450 b	2,224 a	1,814 a	1,084 b	0,483	0,816	0,489 b	0,218 b	0,599 c	0,446 b
DFs 439	4,419 b	2,186 b	1,782 b	1,108 a	0,498	0,815	0,507 a	0,227 a	0,622 a	0,448 b
DFs 465	4,315 b	2,323 a	1,885 a	1,150 a	0,498	0,812	0,496 b	0,215 b	0,611 b	0,433 c
DFs 513	4,356 b	2,146 b	1,745 b	1,103 a	0,470	0,813	0,514 a	0,219 b	0,632 a	0,426 c
DFs 628	4,423 b	2,175 b	1,773 b	1,046 b	0,502	0,815	0,481 b	0,231 a	0,590 c	0,481 a
DFs 2282	4,380 b	2,149 b	1,749 b	1,102 a	0,466	0,814	0,513 a	0,217 b	0,630 a	0,423 c

(*) Tratamento perdido por ataque de formigas cortadeiras.
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$).
$^{(ns)}$ não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Na última avaliação da fluorescência da clorofila *a*, aos 70 DAS, apenas três isolados (DFs 144, DFs 513 e DFs 2282) reduziram os valores de F_V/F_0 (Tabela 7). Os fluxos de ABS/RC e TR_0/RC foram superiores à testemunha nos tratamentos com DFs 119, DFs 144, DFs 359, DFs 465 e DFs 2282. O aumento em relação à testemunha também foi verificado em ET_0/RC e RE_0/RC, para maioria dos isolados, com exceção dos tratamentos DFs 149 e DFs 2282 os quais não promoveram diferenças em ambos os parâmetros.

Os isolados que reduziram F_V/F_0, induziram a mesma resposta em φ_{Po}. Os parâmetros φ_{Eo} e Ψ_{Eo} aumentaram em relação à testemunha nos tratamentos correspondentes a DFs 320, DFs 439 e DFs 628, sendo verificada redução dos mesmos apenas em DFs 2282. De forma geral, todos os parâmetros de razões de fluxos foram reduzidos pelo tratamento DFs 2282. Para os demais isolados, verificou-se valores de φ_{Ro} superiores aos da testemunha nos tratamentos DFs 144, DFs 320, DFs 439 e DFs 628 e valores de δ_{Ro} inferiores em função da microbiolização com DFs 119 e DFs 359.

Tabela 7. Parâmetros do Teste JIP obtidos a partir da determinação de fluorescência da clorofila em plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos aos 70 dias após a semeadura

Tratamentos	Parâmetros do Teste JIP									
	F_V/F_0	ABS/RC	TR_0/RC	ET_0/RC	RE_0/RC	φ_{Po}	φ_{Eo}	φ_{Ro}	Ψ_{Eo}	δ_{Ro}
Testemunha	4,609 a	2,080 b	1,707 b	1,077 b	0,449 b	0,821 a	0,519 b	0,216 b	0,632 b	0,417 a
DFs 104	(*)									
DFs 119	4,499 a	2,166 a	1,771 a	1,122 a	0,455 b	0,818 a	0,518 b	0,211 b	0,633 b	0,406 b
DFs 144	4,243 b	2,209 a	1,786 a	1,133 a	0,503 a	0,809 b	0,514 b	0,228 a	0,635 b	0,444 a
DFs 149	4,545 a	2,044 b	1,673 b	1,039 b	0,437 b	0,819 a	0,510 b	0,215 b	0,622 b	0,420 a
DFs 320	4,553 a	2,089 b	1,712 b	1,113 a	0,485 a	0,820 a	0,533 a	0,233 a	0,651 a	0,436 a
DFs 359	4,565 a	2,181 a	1,787 a	1,139 a	0,446 b	0,820 a	0,523 a	0,205 b	0,638 b	0,392 b
DFs 439	4,451 a	2,146 b	1,751 b	1,132 a	0,495 a	0,816 a	0,528 a	0,231 a	0,646 a	0,436 a
DFs 465	4,386 a	2,251 a	1,831 a	1,162 a	0,479 a	0,814 a	0,516 b	0,213 b	0,634 b	0,414 a
DFs 513	4,045 b	2,169 a	1,737 b	1,095 b	0,466 a	0,801 b	0,506 b	0,215 b	0,631 b	0,426 a
DFs 628	4,468 a	2,137 b	1,743 b	1,146 a	0,476 a	0,817 a	0,537 a	0,224 a	0,658 a	0,416 a
DFs 2282	4,046 b	2,295 a	1,836 a	1,088 b	0,414 b	0,801 b	0,476 c	0,182 c	0,594 c	0,381 b

(*) Tratamento perdido por ataque de formigas cortadeiras.
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$).

O índice de performance relativo a absorção (PI_{abs}) e o índice de performance total (PI_{total}), obtidos nas avaliações de fluorescência da clorofila *a*, são apresentados na Figura 6.

Os valores médios de ambos os índices de performance não diferiram da testemunha aos 42 DAS (Figura 6A e 6B). Porém, aos 58 DAS, seis isolados reduziram os valores de PI_{abs} (DFs 144, DFs 149, DFs 359, DFs 439, DFs 465 e DFs 628), destacando-se DFs 465 com redução de 19% em relação à testemunha (Figura 6C), e PI_{total} (DFs 144, DFs 149, DFs 359, DFs 465, DFs 513 e DFs 2282) com redução na ordem de 27% em DFs 144 (Figua 6D).

Aos 70 DAS, os tratamentos correspondentes a DFs 144, DFs 465, DFs 513 e DFs 2282 promoveram a redução de PI_{abs} (Figura 6E) assim como DFs 119, DFs 359, DFs 465, DFs 513 e DFs 2282 reduziram PI_{total} (Figura 6F). Os maiores decréscimos registrados foram os referentes à microbiolização das sementes com DFs 2282, onde os valores de PI_{abs} e PI_{total} apresentaram-se 31 e 40% inferiores aos da testemunha, respectivamente.

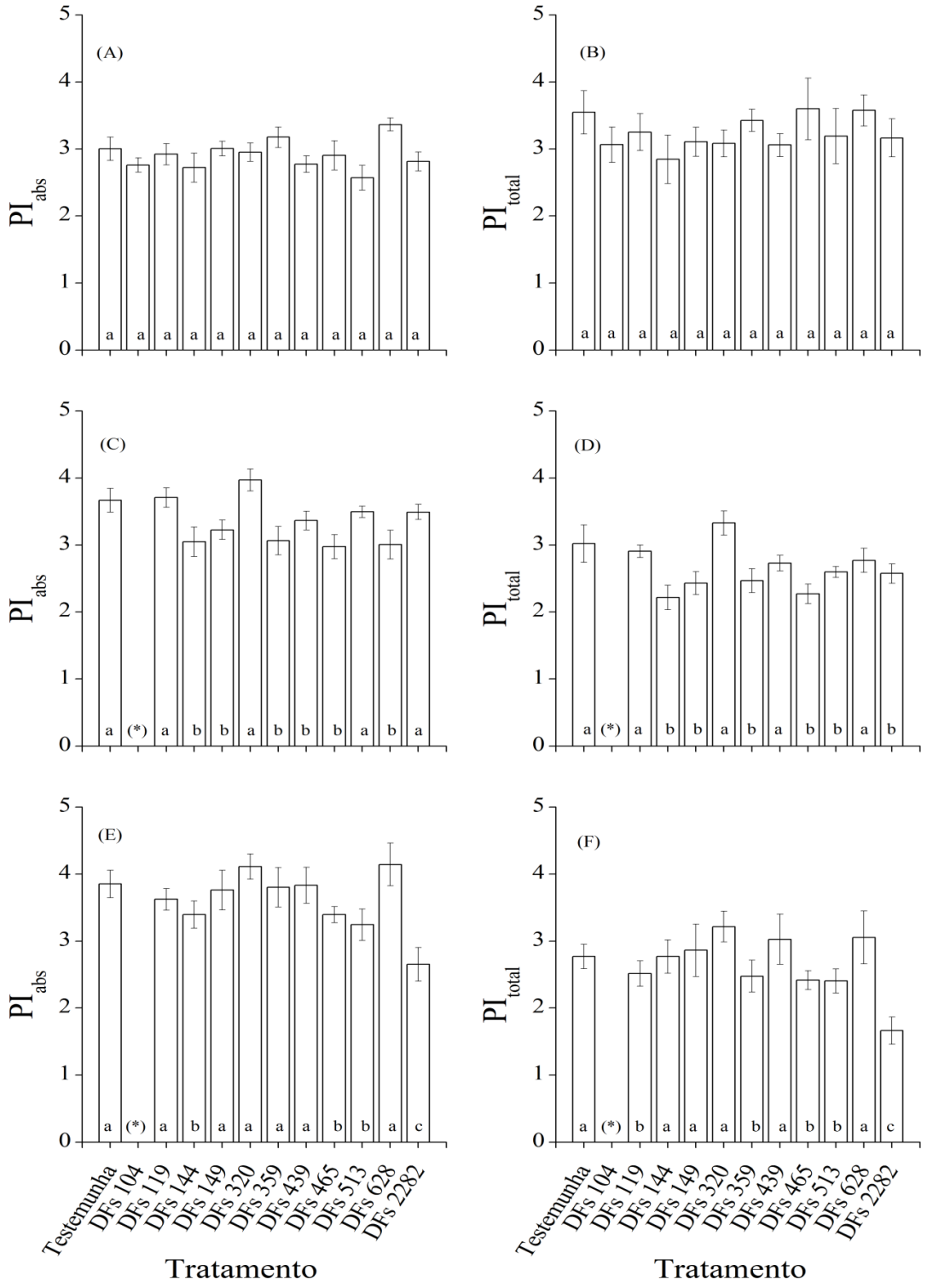

Figura 6. Índice de performance por absorção, PI_{abs}, e índice de performance total, PI_{total}, em plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtidos aos 42 (A e B), 58 (C e D) e 70 (E e F) dias após a sememeadura. Unidade absoluta. As barras representam o erro padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$). (*) Tratamento perdido por ataque de formigas cortadeiras.

Os parâmetros de trocas gasosas determinados durante o experimento são apresentados na Figura 7. Aos 42 DAS, apenas a taxa assimilatória líquida de CO_2 (A) foi influenciada pela microbiolização das sementes, apresentando-se inferior à testemunha nos tratamentos DFs 104, DFs 119, DFs 320, DFs 439 e DFs 465 (Figura 7A). A condutância estomática (g_s) e a concentração interna de CO_2 (C_i) não diferiram estatisticamente dos valores da testemunha (Figura 7B e 7C).

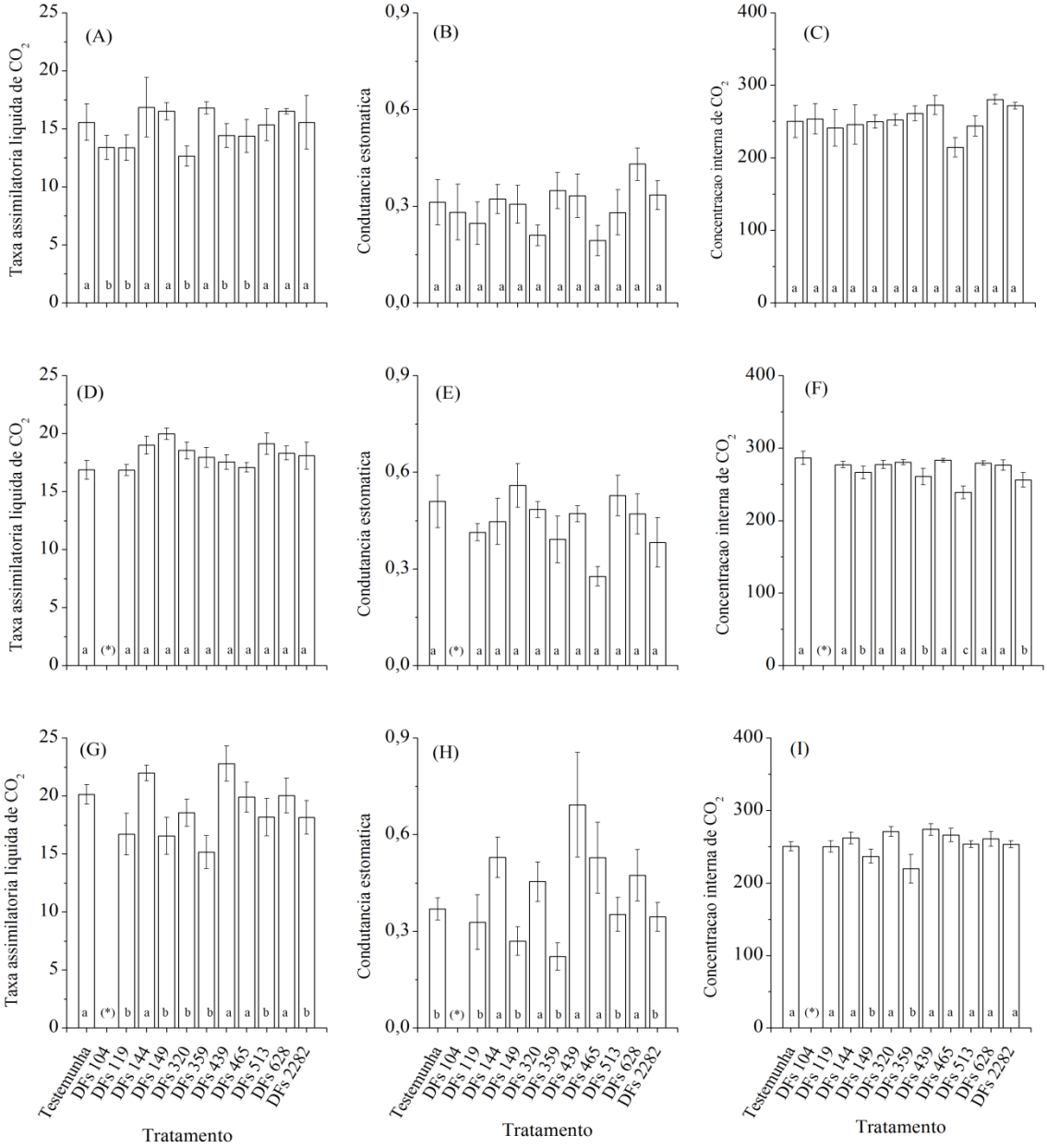

Figura 7. Taxa assimilatória líquida, µmol CO^2 m^{-2} s^{-1}, condutância estomática, mol H_2O m^{-2} s^{-1}, e concentração interna de CO_2, µmol CO^2 mol^{-1} em plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtidos aos 42 (A, B e C), 58 (D, E e F) e 70 (G, H e I) dias após a semeadura. As barras representam o erro padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$). (*) Tratamento perdido por ataque de formigas cortadeiras.

Na segunda avaliação, aos 58 DAS, A (Figura 7D) e g_s (Figura 7E) apresentaram valores semelhantes aos da testemunha, sendo alterado apenas C_i (Figura 7F), o qual foi reduzido nos tratamentos com DFs 144, DFs 359 e DFs 2282 e em maior proporção com DFs 465.

A avaliação realizada aos 70 DAS evidenciou alterações nos três parâmetros de trocas gasosas. Os isolados DFs 119, DFs 149, DFs 320, DFs 359, DFs 513 e DFs 2282 reduziram A em comparação a testemunha (Figura 7G). Entretanto, os isolados DFs 144, DFs 320, DFs 439, DFs 465 e DFs 628 promoveram incrementos nos valores de g_s (Figura 7H). Comportamento de redução semelhante ao verificado no parâmetro A, ocorreu em Ci nos tratamentos DFs 149 e DFs 359 (Figura 7I).

A massa seca da parte aérea das plantas foi superior à testemunha em função da microbiolização das sementes com os isolados bacterianos DFs 465 e DFs 628 (incremento de 174 e 188%, respectivamente) (Figura 8). Entretanto, houve redução do crescimento verificada pelo decréscimo deste parâmetro na ordem de 20 a 40% em relação à testemunha nos tratamentos com DFs 144, DFs 149, DFs 320 e DFs 439 e DFs 2282.

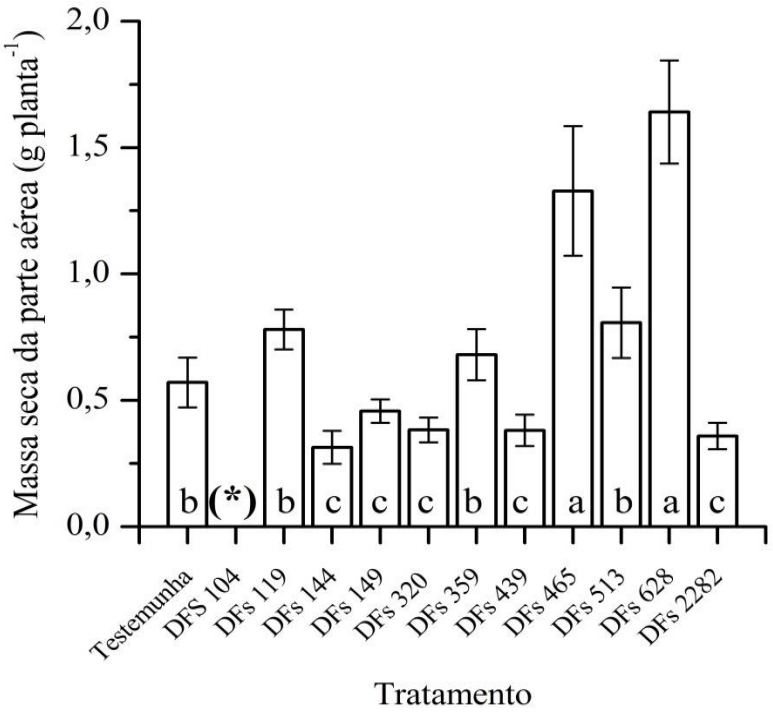

Figura 8. Massa seca da parte aérea, g planta^{-1}, de plantas de canola do híbrido Hyola 433 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtidas aos 77 dias após a semeadura. As barras representam o erro padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$). (*) Tratamento perdido por ataque de formigas cortadeiras.

4.2.2. Etapa II

O percentual de emergência das plântulas de canola é apresentado na Figura 9. Embora, não tenha havido diferença estatística entre os tratamentos, verificou-se uma tendência de redução da emergência das plântulas em função da microbiolização com DFs 144, DFs 320, DFs 465 e DFs 2282 variando de 11 a 22% em relação à testemunha.

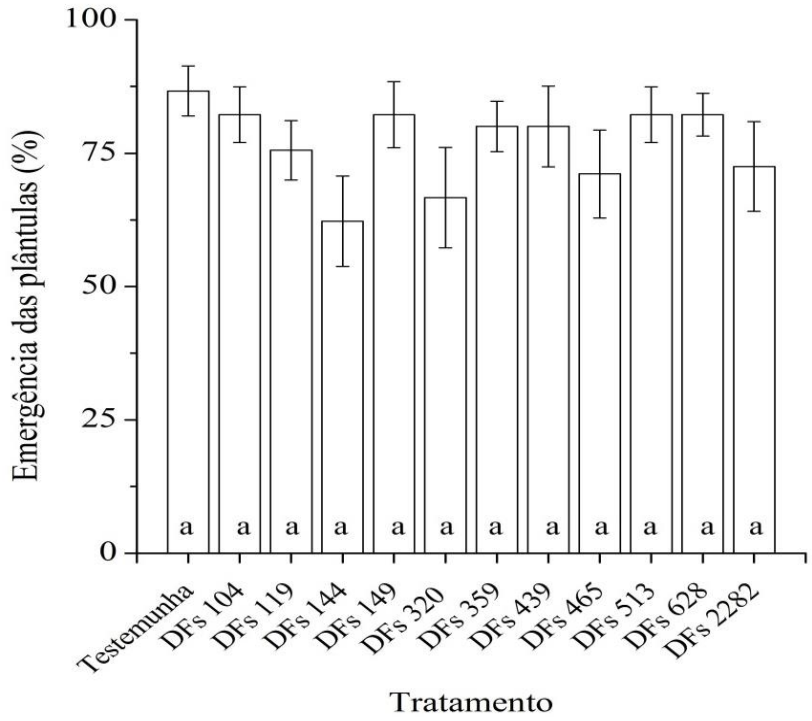

Figura 9. Emergência, %, de plântulas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtida aos 21 dias após a semeadura. As barras representam o erro padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$).

Na Tabela 8, observam-se os efeitos dos tratamentos com os diferentes isolados bacterianos sobre alguns parâmetros do Teste JIP obtidos a partir da fluorescência da clorofila *a* nas folhas das plantas de canola. Verifica-se que a relação máxima do rendimento quântico dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos no FSII (F_V/F_0) foi reduzida pela maioria dos tratamentos (DFs 104, DFs 144, DFs 149, DFs 320, DFs 439, DFs 465 e DFs 513), sendo o mesmo comportamento observado no parâmetro φ_{P0}, que também mostrou decréscimo em relação à testemunha em função dos mesmos isolados.

Tabela 8. Parâmetros do Teste JIP obtidos a partir da determinação de fluorescência da clorofila em plantas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos aos 41 dias após a semeadura

Tratamento	Parâmetros do Teste JIP									
	F_V/F_0	ABS/RC	TR_0/RC	ET_0/RC	RE_0/RC	φ_{Po}	φ_{Eo}	φ_{Ro}	Ψ_{Eo}	δ_{Ro}
Testemunha	4,613 a	2,115 b	1,738 b	1,047$^{(ns)}$	0,455 b	0,822 a	0,496 a	0,216 b	0,604 a	0,434 b
DFs 104	4,368 b	2,225 a	1,810 a	1,091	0,501 a	0,814 b	0,491 a	0,225 a	0,603 a	0,458 a
DFs 119	4,599 a	2,110 b	1,732 b	1,035	0,444 b	0,821 a	0,491 a	0,211 b	0,598 a	0,429 b
DFs 144	4,349 b	2,299 a	1,868 a	1,118	0,506 a	0,813 b	0,487 a	0,220 a	0,599 a	0,453 a
DFs 149	4,365 b	2,293 a	1,864 a	1,105	0,481 a	0,813 b	0,483 b	0,211 b	0,593 b	0,436 b
DFs 320	4,449 b	2,266 a	1,850 a	1,097	0,474 a	0,816 a	0,484 b	0,209 b	0,593 b	0,432 b
DFs 359	4,518 a	2,174 b	1,779 b	1,070	0,464 b	0,819 a	0,493 a	0,214 b	0,602 a	0,434 b
DFs 439	4,262 b	2,295 a	1,857 a	1,076	0,501 a	0,810 b	0,470 b	0,218 a	0,580 b	0,465 a
DFs 465	4,382 b	2,201 b	1,789 b	1,079	0,493 a	0,814 b	0,492 a	0,225 a	0,605 a	0,457 a
DFs 513	4,386 b	2,152 b	1,752 b	1,068	0,498 a	0,814 b	0,497 a	0,232 a	0,610 a	0,466 a
DFs 628	4,491 a	2,105 b	1,721 b	1,036	0,462 b	0,818 a	0,493 a	0,220 a	0,603 a	0,446 a
DFs 2282	4,546 a	2,154 b	1,765 b	1,064	0,457 b	0,820 a	0,494 a	0,212 b	0,603 a	0,430 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$).
$^{(ns)}$ não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Referindo-se aos fluxos específicos por RC, observa-se que ABS/RC e TR_0/RC aumentaram em função da microbiolização com os isolados DFs 104, DFs 144, DFs 149, DFs 320 e DFs 439. Os tratamentos não promoveram diferenças significativas de ET_0/RC em relação à média apresentada pela testemunha. Os mesmo isolados que reduziram os parâmetros F_V/F_0 e φ_{Po}, promoveram o aumento de RE_0/RC.

Dentre os parâmetros que descrevem rendimento/eficiência ou taxas de fluxos, φ_{Eo} e Ψ_{Eo} foram reduzidos nos tratamentos com DFs 149, DFs 320 e DFs 439 e φ_{Ro} assim como δ_{Ro} apresentaram valores superiores aos da testemunha em função da microbiolização das sementes com DFs 104, DFs 144, DFs 439, DFs 465, DFs 513 e DFs 628.

O PI_{abs}, que permite a interpretação do sistema de absorção e aproveitamento da energia na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese, foi reduzido nos tratamentos correspondentes a DFs 104, DFs 144, DFs 149, DFs 320 e DFs 439 (decréscimo de 11 a 23% em relação a testemunha) (Figura 10A). Já, para PI_{total} não foram observadas diferenças estatísticas em relação à testemunha (Figura 10B).

Os isolados DFs 320, DFs 359, DFs 439, DFs 513 e DFs 628 aumentaram os valores médios da área foliar de 19 a 27% quando comparados aos valores da testemunha (Figura 11A). Não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros massa seca das folhas (Figura 11B) e massa seca total da parte aérea (Figura 11C), contudo evidenciou-se uma tendência de incrementos nestes dois parâmetros pelos isolados DFs 513 e DFs 628.

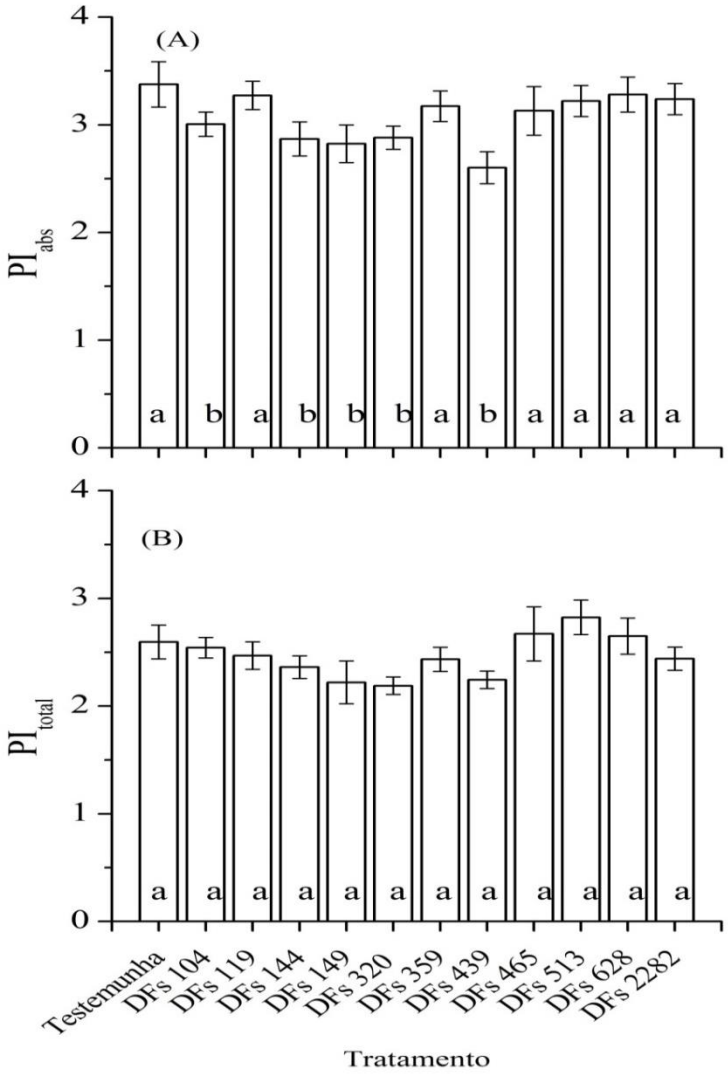

Figura 10. Índice de performance por absorção, PI_{abs} (A) e índice de performance total, PI_{total} (B) de plantas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtidos aos 41 dias após a semeadura. Unidade absoluta. As barras representam o erro padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$).

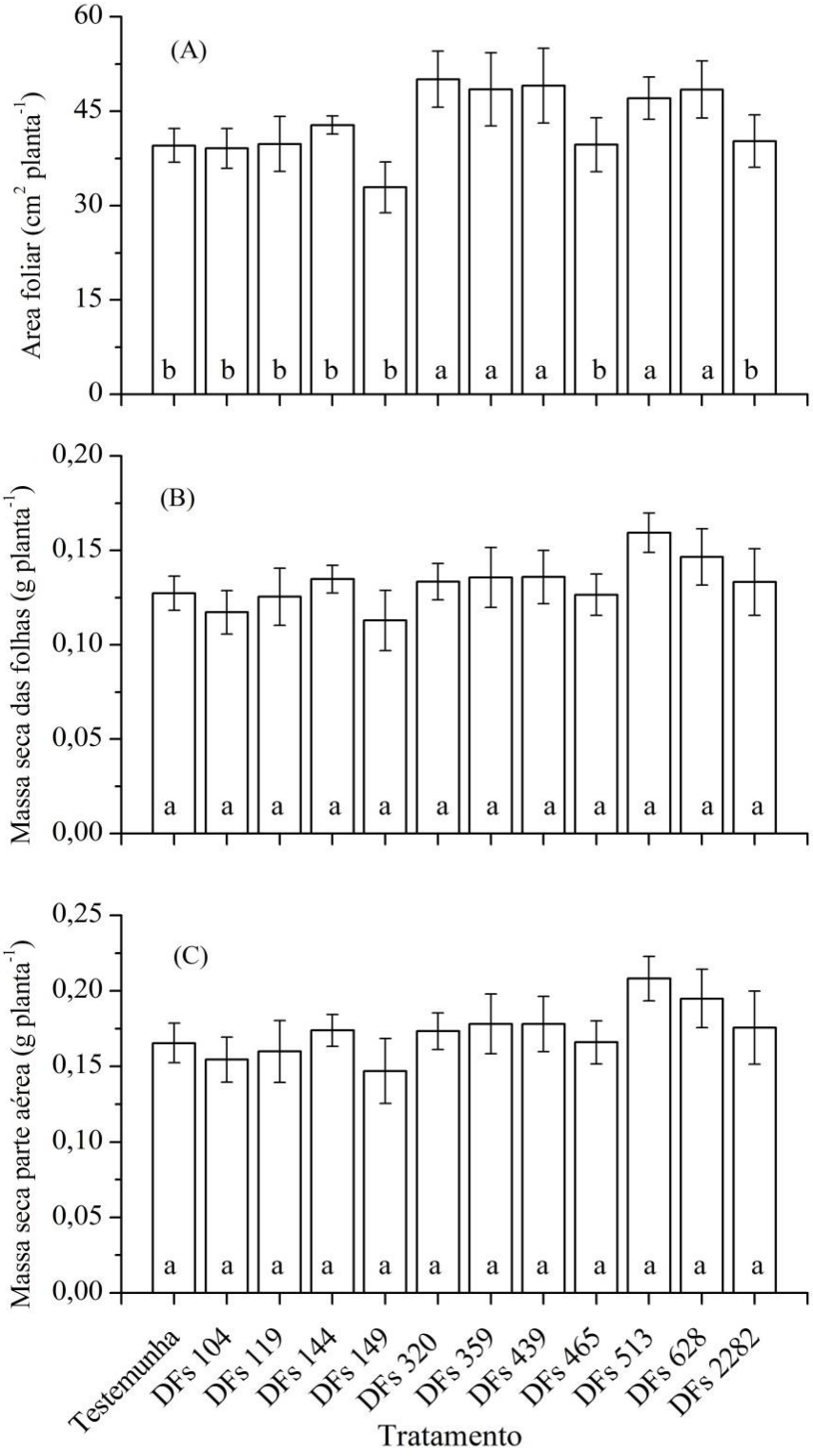

Figura 11. Área foliar, cm^2 planta^{-1}, (A), massa seca das folhas, g planta^{-1}, (B) e massa seca da parte aérea, g planta^{-1}, (C) de plantas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos obtidas aos 41 dias após a semeadura. As barras representam o erro padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p<0,05$).

4.3. Ensaio III

O percentual de plântulas emergidas aos 21 DAS é apresentado na Figura 12, sendo observada pequena variação na emergência das plântulas em relação aos valores obtidos no tratamento testemunha. As percentagens de emergência foram de 98, 88, 84, 92 e 92% para a testemunha, DFs 104, DFs 320, DFs 513 e DFs 628, respectivamente.

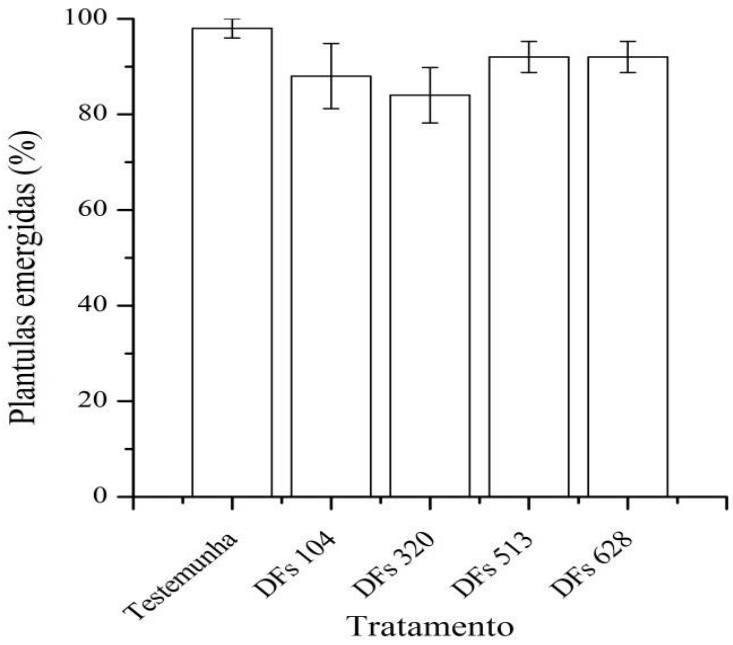

Figura 12. Emergência, %, de plântulas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos aos 21 dias após a semeadura. As barras representam o erro padrão das médias.

O índice de clorofila não apresentou alterações entre os tratamentos nas avaliações realizadas (Figura 13). Porém, diferenciações foram identificadas aos 105 DAS, onde DFs 513 apresentou uma tendência de redução do índice de clorofila em 10% e aos 146 DAS, onde se visualizou uma tendência de aumento de 15% desta variável em comparação ao seu valor no tratamento testemunha.

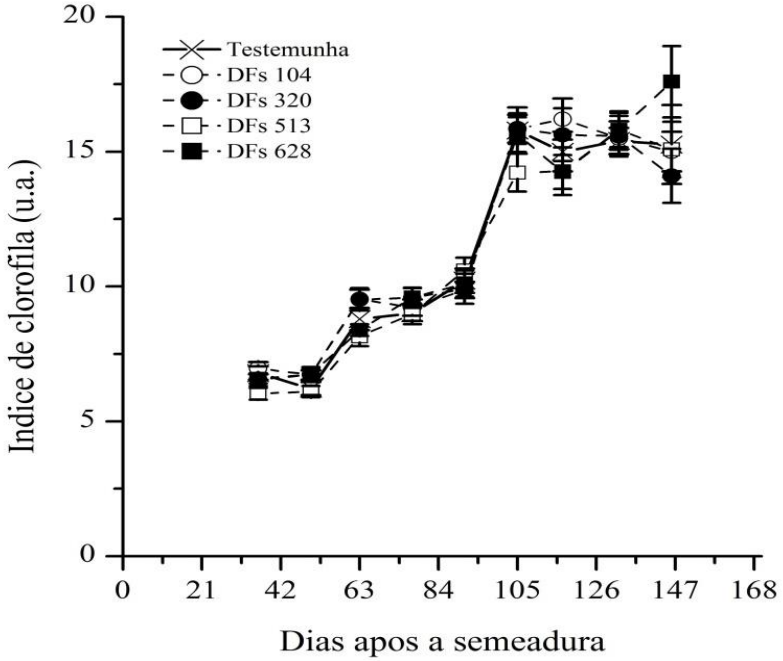

Figura 13. Índice de clorofila, unidade absoluta - u.a., de plantas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos. As barras representam o erro padrão das médias.

O comportamento do PI_{abs} ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta foi semelhante em todos os tratamentos (Figura 14A). De forma geral, verificou-se inicialmente um leve decréscimo do PI_{abs}, seguido por um pico aos 63 DAS e redução na avaliação seguinte. Após 77 DAS, os valores de PI_{abs} foram crescentes até 132 DAS, onde, mais uma vez, foram reduzidos na última avaliação.

Verificaram-se tendências de diferentes respostas dos tratamentos com isolados bacterianos e a testemunha em quatro das avaliações realizadas. Aos 77 DAS os isolados DFs 104 e DFs 320 resultaram em 18 e 13% de redução do PI_{abs} em relação à testemunha, respectivamente. Na quinta avaliação, aos 91 DAS, DFs 104 reduziu novamente PI_{abs} no mesmo percentual em que DFs 513 aumentou este parâmetro (11%). Aos 132 DAS, observou-se que os tratamentos com DFs 320 e DFs 513 promoveram decréscimos da variável em questão, na ordem de 11 e 14%, respectivamente.

Para PI_{total} (Figura 14B), pode-se destacar maior variação das respostas dos tratamentos ao longo do ciclo da planta, sendo verificadas as seguintes tendências de alteração do parâmetro em relação à testemunha: a) redução de 14% no tratamento com DFs 513 aos 36 DAS; b) incrementos ocasionados por DFs 104 (19%) e DFs 320 (26%) aos 50 DAS; c) redução, pelos tratamentos com DFs 104 e

DFs 628, de 19 e 15% aos 77 DAS e de 14 e 15% aos 91 DAS, respectivamente; d) e redução pelo tratamento com DFs 513 (17%) aos 132 DAS.

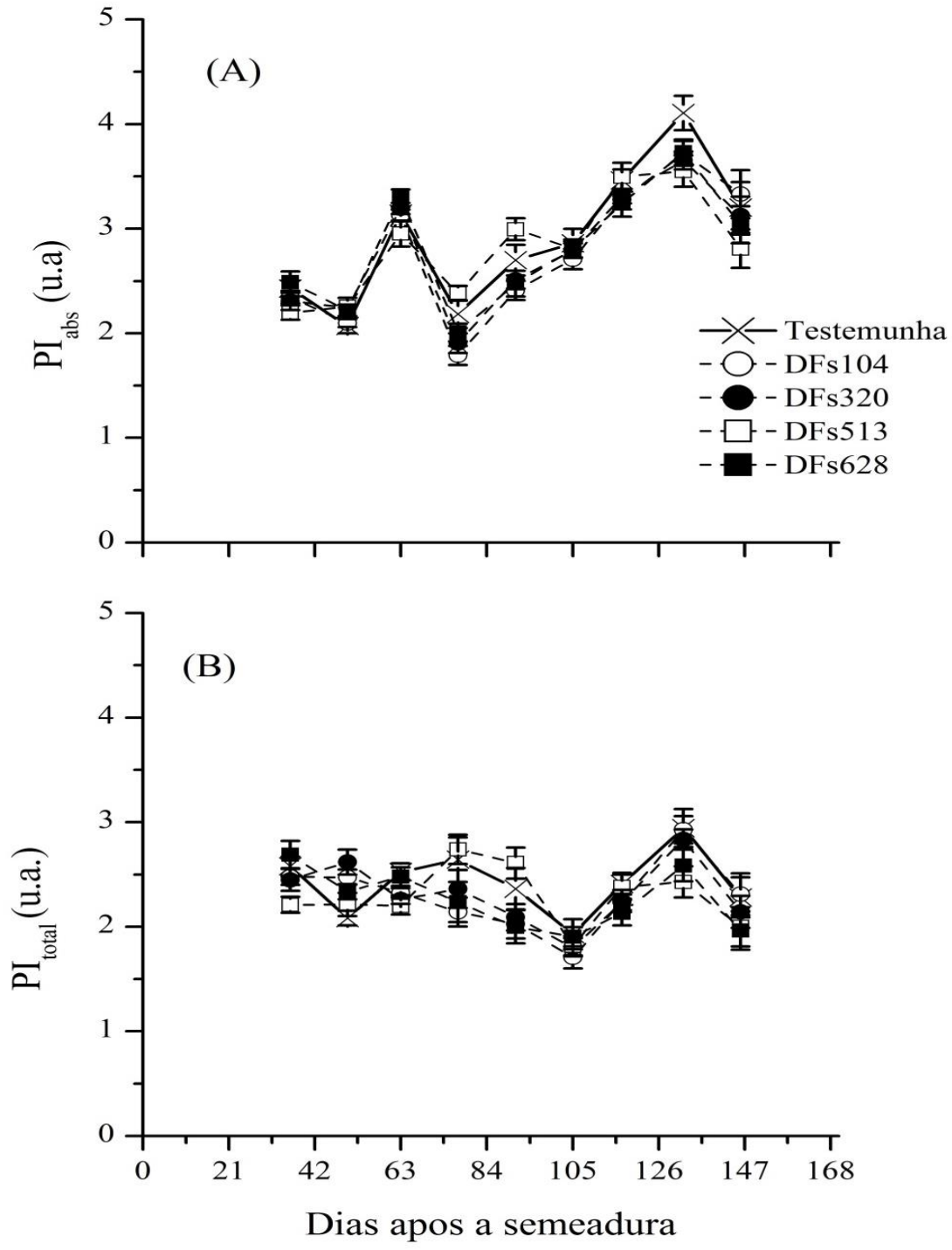

Figura 14. Índice de performance por absorção, PI_{abs}, (A) e índice de performance total, PI_{total}, (B), unidade absoluta - u.a., de plantas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos. As barras representam o erro padrão das médias.

A área foliar das plantas, ao longo do ciclo, diferiu de acordo com os tratamentos (Figura 15A). Os picos correspondentes às maiores áreas foliares ocorreram aos: 77 DAS para DFs 320; 91 DAS para a testemunha e DFs 628; 105 DAS para DFs 513; e 118 DAS para DFs 104.

As diferenças entre as plantas originadas de sementes microbiolizadas e as plantas correspondentes à testemunha iniciaram a partir dos 50 DAS, onde todos isolados promoveram aumento da área foliar. Em geral, os maiores incrementos foram obtidos nos tratamentos DFs 513 e DFs 628 até os 118 DAS, chegando a 201,97 e 168,84 cm^2 $planta^{-1}$, respectivamente. Embora o tratamento DFs 320 tenha apresentado área foliar máxima próxima da testemunha (77 DAS), observou-se redução do parâmetro em relação à mesma no decorrer do experimento.

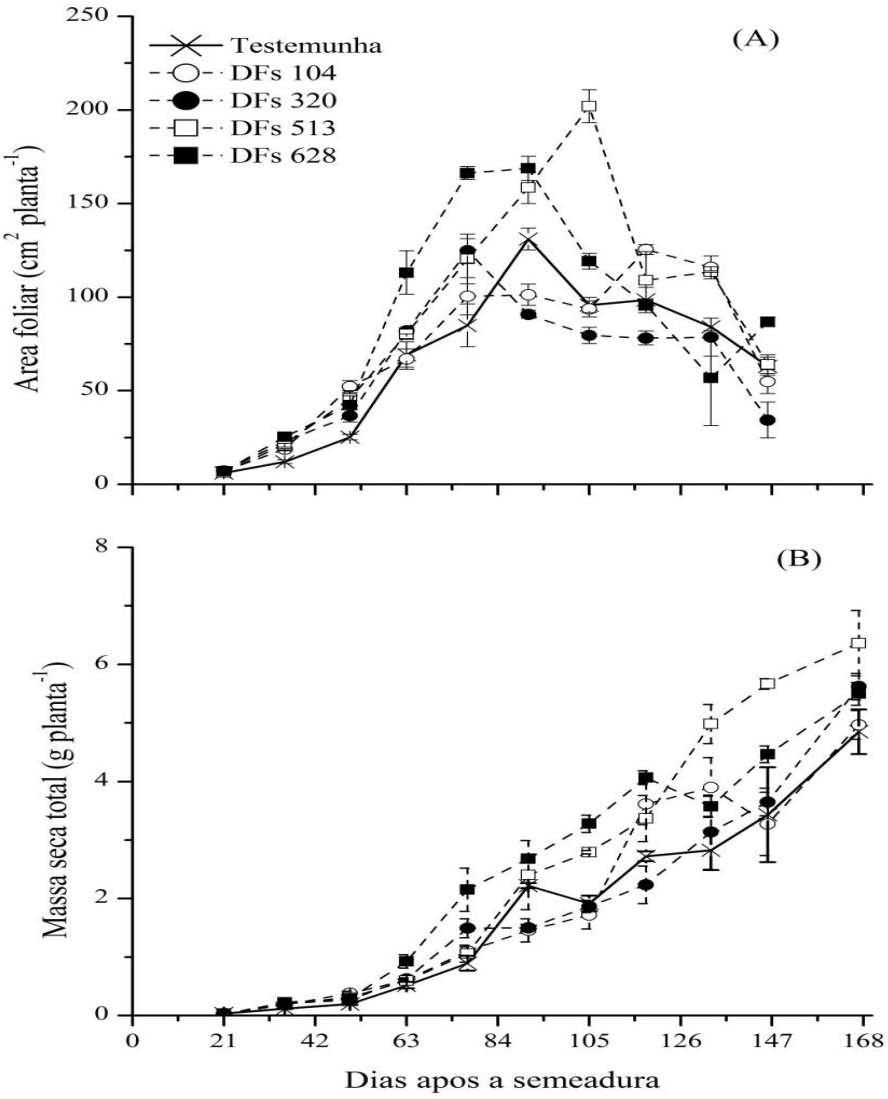

Figura 15. Área foliar, cm^2 $planta^{-1}$, (A) e massa seca total, g $planta^{-1}$, (B) de plantas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos. As barras representam o erro padrão das médias.

A massa seca total das plantas também aumentou em função dos tratamentos que incrementaram a área foliar (Figura 15B). Observa-se que DFs 628 promoveu o aumento da variável em relação aos valores da testemunha a partir dos 63 DAS, sendo observada esta resposta para DFs 513 apenas aos 105 DAS. As maiores médias da massa seca total foram obtidas na última coleta, atingindo valores de 6,37 g planta^{-1} com DFs 513, 6,62 g planta^{-1} para DFs 320 e 5,50 g planta^{-1} para DFs 628.

A partição de assimilados entre os diferentes órgãos das plantas de canola foi modificada ao longo da ontogenia (Figura 16). De forma geral, pode-se destacar que o acúmulo de massa seca nas folhas foi crescente até os 77 DAS, onde, a partir desta coleta, passou a ser reduzido. Comportamento similar foi verificado nos caules e pecíolos, que acumularam maiores quantidades de assimilados até a décima coleta, aos 146 DAS. Ao final do experimento, aos 167 DAS, verificou-se a redução da matéria seca total das raízes e caules juntamente com pecíolos, assim como a inexistência de folhas verdes, em virtude da intensa remobilização e alocação de assimilados nos órgãos dreno, as síliquas.

No início do crescimento, aos 21 DAS, o acúmulo de massa seca nas folhas nos tratamentos com DFs 320 e DFs 628, foi superior à testemunha, reduzindo o percentual destinado às raízes em relação à massa seca total da planta (Figura 16A). Após este período, os tratamentos apresentaram o mesmo comportamento de distribuição dos assimilados entre os diferentes órgãos até a quinta coleta (Figura 16E). Aos 91 DAS, verificou-se que a alocação de massa seca nas folhas foi reduzida nos tratamentos com DFs 320 e DFs 513 devido ao aumento da massa seca da raiz e da massa seca do caule, respectivamente, em comparação com a testemunha (Figura 16F).

Na sétima coleta, aos 105 DAS, os tratamentos DFs 320 e DFs 628 promoveram maior percentagem de acúmulo de massa seca nas raízes em relação à testemunha (Figura 16G). Aos 118 DAS, verificou-se o surgimento de inflorescências nas plantas de todos os tratamentos e em maior proporção nos correspondentes a DFs 513 e DFs 628 (1,2 e 2,2% em relação à massa seca total da planta, respectivamente), ocasionando redução do percentual de massa seca concentrado nas folhas em relação aos demais tratamentos (Figura 16H).

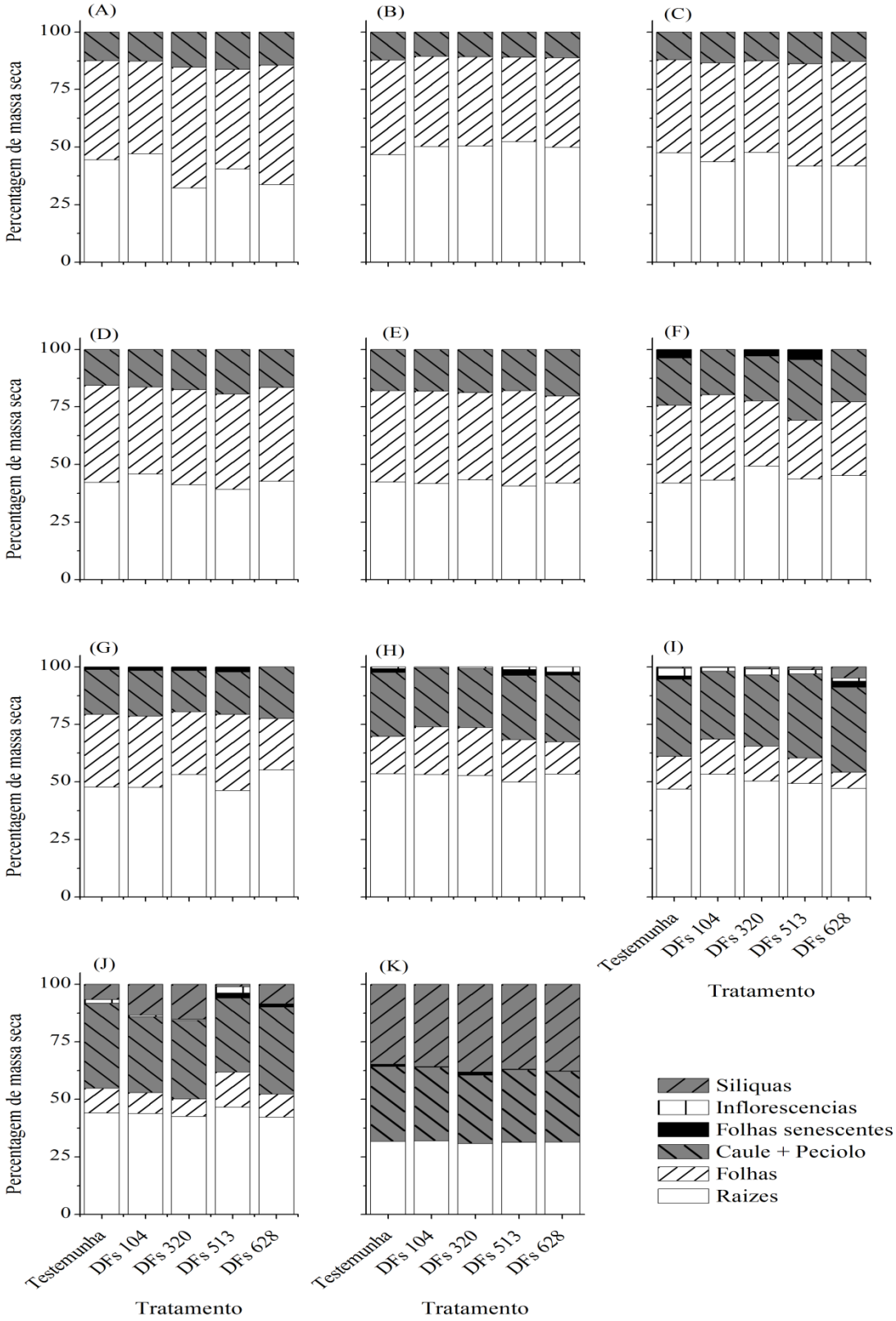

Figura 16. Partição de assimilados, % de massa seca, de plantas de canola do híbrido Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com isolados bacterianos em diferentes períodos do ciclo de desenvolvimento. (A) 21; (B) 35; (C) 50; (D) 63; (E) 77; (F) 91; (G) 105; (H) 118; (I) 132; (J) 146; (K) 167 dias após a semeadura.

Aos 132 DAS, verificou-se a presença de síliquas em todos os tratamentos, e em maior proporção em DFs 628 (4,9% em relação à massa seca total da planta) (Figura 16I). Ainda nesta coleta, a alocação de matéria seca para a raiz com o tratamento DFs 104 foi superior à testemunha e o percentual de matéria seca destinada as folhas foi reduzido por DFs 513 e DFs 628. Aos 146 DAS, as síliquas acumularam diferentes quantidades de matéria seca em cada um dos tratamentos, dentre os quais se destacaram DFs 104 e DFs 320 com 13,4 e 15,2% de acúmulo em relação à massa seca total da planta (Figura 16J). Ao final do crescimento (167 DAS) a distribuição de assimilados nos diferentes órgãos das plantas foi bastante similar em todos os tratamentos, não sendo observadas diferenças marcantes (Figura 16K).

Os componentes de produção, determinados ao final do experimento, são apresentados na Tabela 9. Embora não tenham sido verificadas diferenças estatísticas, é possível observar ligeiras diferenças entre os tratamentos. Observou-se uma tendência de acréscimo do número de síliquas planta^{-1} (24 a 29%) em relação à testemunha nos tratamentos DFs 320, DFs 513 e DFs 628. Resposta similar foi verificada na quantidade de grãos pelos tratamentos DFs 513 e DFs 320. Adicionalmente, nestes tratamentos e no tratamento DFs 628 foi verificado uma tendência de incremento da massa fresca dos grãos variando de 17 a 25%. O isolado DFs 628 apresentou tendência de aumento da massa fresca de mil grãos (10% em relação à testemunha).

Tabela 9. Componentes de produção de plantas do híbrido de canola Hyola 61 originadas de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos.

Tratamento	Número de síliquas planta^{-1}	Número de grãos planta^{-1}	Massa fresca dos grãos planta^{-1} (g)	Número de grãos síliqua^{-1}	Massa fresca de 1000 grãos (g)
Testemunha	23,3±1,2$^{(ns)}$	296±16$^{(ns)}$	0,909±0,070$^{(ns)}$	12,8±0,4$^{(ns)}$	3,061±0,153$^{(ns)}$
DFs 104	25,5±2,1	278±22	0,864±0,090	11,3±1,3	3,111±0,215
DFs 320	28,8±2,6	335±34	1,085±0,138	11,9±1,3	3,208±0,087
DFs 513	30,0±0,6	347±15	1,139±0,028	11,6±0,7	3,301±0,218
DFs 628	29,8±1,8	315±16	1,059±0,054	10,7±0,6	3,377±0,106

$^{(ns)}$ não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$) [n=5].

A composição dos ácidos graxos presentes nos grãos coletados (Tabela 10) dos tratamentos de microbiolização não diferiu dos valores encontrados na tetemunha. O ácido oleico (C18:1) foi predominante nos grãos de todos os tratamentos correspondendo a 60% dos ácidos graxos determinados.

Tabela 10. Composição de ácidos graxos (C16:0 - C18:3) em grãos de canola obtidos de plantas originadas de sementes microbiolizadas com diferentes rizobactérias.

Tratamento	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oleico (C18:1)	Ácido linoleico (C18:2)	Ácido linolênico (C18:3)
	Percentagem em área				
Testemunha	6,5±0,1^{ns}	2,1±0,1^{ns}	59,8±0,5^{ns}	19,1±0,1^{ns}	12,3±0,4^{ns}
DFs104	6,1±0,2	2,1±0,1	61,9±0,7	18,7±0,4	10,9±0,2
DFs320	6,5±0,2	2,0±0,1	61,5±0,6	18,5±0,1	11,2±0,2
DFs513	6,0±0,3	2,2±0,3	61,1±0,1	18,4±0,1	12,0±0,3
DFs620	6,4±0,3	1,9±0,2	59,7±0,2	19,4±0,1	12,4±0,5

$^{(ns)}$ não houve diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$) [n=4].

5. DISCUSSÃO

O efeito da inoculação das sementes com rizobactérias é o resultado de complexas interações que ocorrem entre estes microrganismos e seus hospedeiros. As medidas biométricas de crescimento têm sido amplamente utilizadas como ferramentas para avaliar as respostas dos vegetais frente aos microrganismos promotores de crescimento, gerando informações amplamente relatadas.

A avaliação do comportamento/atividade do fotossistema II (FSII) por meio dos parâmetros obtidos através da fluorescência da clorofila é pouco empregada para detectar e avaliar respostas positivas relacionadas a fatores benéficos. Contudo, no presente estudo, a análise da fluorescência da clorofila *a* através do Teste JIP, assim como as medições das trocas gasosas, foram empregadas para verificar as características fotossintéticas de plantas de canola provenientes de sementes microbiolizadas com diferentes isolados bacterianos.

Devido à rapidez na realização das medidas e obtenção dos resultados, e principalmente por constituir-se em uma técnica não destrutiva, a fluorescência da clorofila *a* pode ser utilizada para o “screening” de várias amostras, contribuindo

assim para seleção de microrganismos de interesse (TSIMILLI-MICHAEL et al., 2000).

Os resultados da análise da área foliar e da massa seca da parte áerea das plantas originadas das sementes microbiolizadas no Ensaio I, permitiram identificar tratamentos que promoveram o crescimento destas, sendo DFs 144, DFs 185 e DFs 628 os isolados que apresentaram os efeitos mais marcantes. Estes resultados estão de acordo às respostas de promoção do crescimento identificadas em várias culturas, através de ensaios com inoculação de sementes ou solo com uma ampla gama de rizobactérias (SINGH et al., 2010).

Além disso, alguns parâmetros da fluorescência foram selecionados neste estudo como variáveis de interesse em virtude da maior correlação com os parâmetros de crescimento avaliados. Garson (2009) cita que o coeficiente de correlação de Pearson estabelece uma medida de associação bivariada (força) do grau de relacionamento entre duas variáveis, ou mesmo uma medida de associação linear entre variáveis. Dentre os parâmetros do Teste JIP que mais se associaram com as variáveis de crescimento, PI_{abs} e PI_{total} foram superiores à testemunha em 65 e 55% dos isolados, respectivamente, sendo utilizados para a seleção das bactérias empregadas no decorrer do experimento.

Em ensaio realizado com bactérias fixadoras de nitrogênio (*Azospirillum* e *Rhizobium*) e fungo micorrízico, PI_{abs} foi um dos parâmetros do Teste JIP capaz de detectar os efeitos de sinergismo e antagonismo verificados pela combinação destes microrganismos em plantas de alfafa (TSIMILLI-MICHAEL et al., 2000).

Segundo Stirbet e Govindjee (2011), um grande número de estudos relacionados à fotossíntese utilizam o parâmetro F_V/F_M, baseado nos valores de florescência em F_0 e F_M, para detectar alterações no funcionamento do aparato fotossintético, porém este parâmetro nem sempre é sensível o suficiente para detectar diferenças entre diversas amostras. O índice de performance, calculado através de componentes individuais obtidos pelo Teste JIP, foi estabelecido por Srivastava et al. (1999) como um parâmetro mais responsivo, capaz de detectar alterações na cadeia de transporte de elétrons mais facilmente do que através de um parâmetro isolado.

Os índices de performance fotossintéticos, PI_{abs} e PI_{total}, são produtos de parâmetros que expressam potenciais parciais para a conservação de energia em bifurcações de energia sequenciais, a partir do éxciton para a redução do

intersistema de aceptores de elétrons e redução dos aceptores finais do FSI, respectivamente (YUSUF et al., 2010).

O índice de performance por absorção (PI_{abs}) é uma combinação de três componentes parciais, que descrevem: a) a quantidade de RC fotossintético (RC/ABS); b) o fluxo máximo de energia que atinge o RC do FSII [$\varphi_{Po}/(1- \varphi_{Po})$]; e c) o transporte de elétrons no início da iluminação [$\Psi_{Eo}/(1- \Psi_{Eo})$], conforme equação abaixo:

$$\mathrm{PI_{abs}} = \frac{\mathrm{RC}}{\mathrm{ABS}} \times \left(\frac{\varphi_{\mathrm{Po}}}{1 - \varphi_{\mathrm{Po}}}\right) \times \left(\frac{\Psi_{\mathrm{Eo}}}{1 - \Psi_{\mathrm{Eo}}}\right) = \frac{\mathrm{RC}}{\mathrm{ABS}} \times \frac{\mathrm{TR_0}}{\mathrm{DI_0}} \times \frac{\mathrm{ET_0}}{1 - \mathrm{ET_0}}$$

Por sua vez, o índice de performance total (PI_{total}) conta com mais um componente (introduzido por Tsimilli-Michael e Strasser, 2008), que descreve as reações de oxidação e redução que ocorrem no lado aceptor de elétrons do FSI sendo descrito pela seguinte fórmula:

$$\mathrm{PI_{total}} = \mathrm{PI_{abs}} \times \left(\frac{\delta_{\mathrm{Ro}}}{1 - \delta_{\mathrm{Ro}}}\right)$$

Por meio dos critérios de seleção estabelecidos, determinou-se o conjunto de tratamentos utilizado no Ensaio II, formado por isolados que promoveram incrementos nos parâmetros de crescimento (DFs 119, DFs 149 e DFs 628); isolados que aumentaram os parâmetros de crescimento e os índices de performance (DFs 144, DFs 185 e DFs 359); isolados que aumentaram apenas os índices de performance (DFs 320, DFs 439 e DFs 465); e isolados que induziram comportamento similar ao da testemunha (DFs 104, DFs 513 e DFs 2282).

As respostas dos parâmetros do Teste JIP ocasionadas pelos tratamentos de microbiolização das sementes foram distintas ao longo do desenvolvimento das plantas de canola do híbrido Hyola 433. Entre as principais alterações observadas aos 42 DAS pode-se observar a maximização do rendimento quântico máximo fotoquímico primário (φ_{Po}) e da relação máxima do rendimento quântico dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos no FSII (F_V/F_0) pelos tratamentos com DFs 104, DFs 119, DFs 149, DFs 320, DFs 359 e DFs 628. Estes dois parâmetros são estreitamente relacionados (ROHÁČEK, 2002) e sugerem que os tratamentos mencionados acima foram capazes de maximizar a transferência de elétrons no lado doador do FSII (JAFARINIA & SHARIATI, 2012). A redução dos parâmetros ET_0/RC (fluxo de transporte de elétrons além de Q_A), φ_{Eo} (rendimento quântico para o transporte de elétrons) e Ψ_{Eo} (eficiência/probabilidade que um elétron se mova além

de Q_A) também foi observada neste período pelos tratamentos DFs 104, DFs 144, DFs 149 e DFs 320 e DFs 2282. Os decréscimos de φ_{Eo} e da eficiência da transferência de elétrons de Q_A^- para Q_B (Ψ_{Eo}) indicam que possivelmente o lado aceptor do intersistema dos transportadores de elétrons tenha sido afetado pelos tratamentos, ocasionando limitações no processo de reoxidação de Q_A^-.

Embora, o transporte de elétrons além da Q_A tenha diminuido, esta alteração não foi capaz de interferir na redução dos aceptores de elétrons do fotossistema I (FSI). Além disso, os índices de performance não detectaram diferenças no funcionamento do aparato fotossintético entre as plantas provenientes de semente microbiolizadas e as plantas correspondentes a testemunha.

Os parâmetros relacionados ao transporte de elétrons (ET_0/RC e Ψ_{Eo}) foram maximizados pelo procedimento de microbiolização com alguns isolados aos 58 DAS, ou seja, pode-se inferir que o fluxo de energia direcionada além de Q_A foi intensificado pelos tratamentos DFS 119, DFs 149, DFs 320, DFs 439, DFs 513 e DFs 2282.

Contudo, os isolados DFs 144, DFs 149, DFs 465 e DFs 513 foram inferiores a testemunha nos parâmetros φ_{Ro} (rendimento quântico para redução dos aceptores de elétrons do lado aceptor do FSI) e δ_{Ro} (eficiência/probabilidade que um elétron do intersistema de carreadores de elétrons se mova para reduzir os aceptores de elétrons finais no lado aceptor do FSI), evidenciando, neste período, a redução do transporte de elétrons ao final da fase fotoquímica em função destes tratamentos. Os índices de performance demonstraram decréscimo do desempenho das reações fotoquímicas entre o FSII e o FSI em alguns tratamentos, com diferenças mais acentuadas ocasionadas por DFs 144, DFs 359 e DFs 465. As alterações destes índices ocorreram em virtude da redução de, pelo menos um de seus componentes, ou seja, a redução de RC/ABS e Ψ_{Eo} foi responsável pelos decréscimos de PI_{abs} e estes dois parâmetros juntamente com δ_{Ro} diminuíram PI_{total} nos três tratamentos.

Embora a grande maioria dos tratamentos apresentasse parâmetros do Teste JIP semelhantes ou superiores à testemunha na fase final do experimento (70 DAS), os índices de performance foram reduzidos em relação a testemunha por alguns dos tratamentos, principalmente por DFs 513 e DFs 2282. A alteração do PI_{abs} do tratamentos DFs 513 foi verificada em função da diminuição de φ_{Po}, assim como para DFs 2282 juntamente com Ψ_{Eo}. A redução de PI_{total} foi ocasionada pelos componentes que influenciaram PI_{abs} e pelo decréscimo de δ_{Ro} em DFs 2282.

As principais reduções na taxa assimilatória líquida de CO_2 (A) foram provocadas pelos tratamentos com DFs 104, DFs 119 e DFs 320 aos 42 DAS e DFs 119, DFs 149 e DFs 359 aos 70 DAS. Ao observar os dados correspondentes a todas as avaliações de trocas gasosas, infere-se que a redução de A não pode ser atribuída ao aumento da resistência difusiva estomática e a redução da disponibilidade interna de CO_2 estando possivelmente relacionada com alterações na funcionalidade do aparelho fotossintético verificadas pelas diferenças na fluorescência da clorofila *a* como, por exemplo, a redução de PI_{total} nos tratamentos DFs 119 e DFs 359 aos 70 DAS.

A microbiolização das sementes com os isolados bacterianos DFs 465 e DFs 628 promoveu o crescimento das plantas de canola através do aumento da massa seca da parte aérea em relação à testemunha. Resultado semelhante foi obtido em estudo realizado com plantas de canola, que demonstrou que a microbiolização de sementes com bactérias (*Achromobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Chryseobacterium*) isoladas da rizosfera e das raízes da própria espécie, resulta em maior acúmulo de massa seca total da parte aérea em relação às plantas não inoculadas (FARINA et al., 2012).

Todavia, é importante destacar que os tratamentos com os isolados DFs 144, DFs 149, DFs 320, DFs 439 e DFs 2282 promoveram redução do acúmulo de biomassa na parte aérea das plantas, evidenciando a importância dos estudos para estabelecer as efetivas respostas promovidas no crescimento em virtude da inoculação de sementes com diferentes gêneros bacterianos.

Na Etapa II do Ensaio II, as principais alterações dos parâmetros do Teste JIP verificadas nas plantas do híbrido Hyola 61 foram à redução de F_V/F_0 e φ_{Po}, refletindo uma diminuição na capacidade do FSII em reduzir o aceptor primário Q_A (CALATAYUD & BARRENO, 2001), assim como o aumento dos parâmetros referentes à redução do lado aceptor do FSI (RE_0/RC, φ_{Ro} e δ_{Ro}) pelos tratamentos DFs 104, DFs 144, DFs 439, DFs 465 e DFs 513. A maximização do rendimento e da eficiência do movimento de elétrons na fase final da etapa fotoquímica pode ser uma estratégia das plantas para compensar o baixo rendimento durante o processo de captação de luz no FSII e de transporte de elétrons ao longo da cadeia transportadora (GAMA, 2013). O PI_{abs} foi reduzido pelos tratamentos correspondentes a DFs 104, DFs 144, DFs 149, DFs 320 e DFs 439 em função da diminuição de RC/ABS (dados não mostrados) e φ_{Po} para os cinco tratamentos e de

Ψ_{Eo} para DFs 439. Contudo, devido a maximização do desempenho das reações de oxi-redução do FSI, o PI_{total} não foi alterado em relação a testemunha.

Efeitos positivos nos parâmetros de crescimento também foram obtidos pelo procedimento de microbiolização das sementes de Hyola 61. Os isolados DFs 320, DFs 359, DFs 439, DFs 513 e DFs 628 aumentaram os valores médios da área foliar quando comparados aos valores da testemunha. Além disso, a massa seca das folhas e massa seca total da parte aérea apresentaram uma tendência de aumento nos tratamentos com DFs 513 e DFs 628. Os incrementos observados nestes parâmetros de crescimento podem estar relacionados a uma série de mecanismos de ação característicos de cada isolado bacteriano como, por exemplo, a facilitação na aquisição de nutrientes, síntese de reguladores de crescimento e diminuição dos efeitos inibitórios de patógenos resultando consequentemente em aumento da vitalidade e vigor da planta (HAYAT et al., 2010).

No Ensaio III o desempenho da cadeia de transporte de elétrons foi monitorado através da análise dos índices de performance (Figura 14). Da mesma forma que nos ensaios anteriores, tendências de decréscimo tanto de PI_{abs} quanto de PI_{total} ocasionadas por alguns tratamentos foram as verificadas em relação à testemunha. Estas respostas não foram observadas em todas as avaliações, mas sim em períodos específicos (77, 91 e 132 DAS). Dentre os tratamentos, DFs 104, DFs 320 e DFs 513 apresentaram uma tendência de diminuição de PI_{abs} e DFs 104, DFs 513 e DFs 628 de PI_{total}.

Os tratamentos correspondentes aos isolados DFs 513 e DFs 628 promoveram incrementos da área foliar das plantas os quais iniciaram aos 50 DAS, atingindo os maiores valores, entre todos os tratamentos, até os 118 DAS. O aumento da área das folhas tem como objetivo elevar o potencial da fonte, inicialmente pela maior captação de energia luminosa para o processo fotossintético, visando maximizar a produção de material orgânico que será destinado para manutenção estrutural e o crescimento vegetal, aumentando consequentemente a matéria seca da planta (LOPES & MAESTRI, 1973).

Dessa forma, estes isolados, assim como DFs 320, promoveram incrementos da massa seca total das plantas (Figura 15B). Estes efeitos positivos no acúmulo de biomassa foram identificados inicialmente pelo tratamento com DFs 628 [*Bacilus* sp.] (63 DAS) e em estágio mais avançado do ciclo com DFs 513 [*Pseudomonas veronii*] (105 DAS). As médias de massa seca total das plantas no tratamento com DFs 320

foram bastante variáveis, sendo até mesmo reduzidas em algumas coletas, porém, atingindo valores superiores aos da testemunha na avaliação final.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de demonstrar os efeitos positivos no crescimento através da inoculação de plantas de diversas espécies com rizobactérias, corroborando com os resultados observados no presente trabalho. Dastager et al. (2011) verificaram aumento do crescimento da raiz e da parte aérea de plantas de *Piper nigrum* inoculadas com *Bacillus tequilensis*. Em ensaio realizado com a inoculação de sementes de arroz pela irrigação do substrato com suspensões de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudacidovorax*, *Rhizobium* e *Azospirillum*, Souza et al. (2013) observaram aumento do acúmulo de biomassa da parte aérea e da raiz na ordem de 96 e 85% em relação a testemunha. Por sua vez, Liu et al. (2013) constataram que mesmo que a inoculação com *Bacillus subtilis* não fosse capaz de promover o crescimento de plantas da espécie *Fraxinus americana*, sua utilização em combinação com fertilizante resultou em aumento do acúmulo de matéria seca total da planta em comparação com a aplicação de fertilizante de forma isolada.

Segundo Vessey (2003), uma única espécie de bactéria pode apresentar vários mecanismos de ação que atuam na promoção do crescimento/desenvolvimento da planta hospedeira. Entre as várias PGPR identificadas, *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., as quais foram capazes de estimular o crescimento das plantas de canola, dispõem de uma ampla distribuição e são extensivamente estudadas.

A promoção do crescimento das plantas através dos diferentes membros dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* tem sido atribuída a diversas propriedades, que podem estar relacionadas ao aumento da área foliar e da massa seca total das plantas de canola verificados no presente estudo. Entre os mecanismos de promoção do crescimento vegetal, a fixação biológica de nitrogênio tem sido observada em espécies destes gêneros (CAKMAKCI et al., 2006; JOSEPH et al., 2007). A redução do nitrogênio atmosférico à amônia, por meio do complexo da enzima nitrogenase presente nestas bactérias, aumenta a disponibilidade deste nutriente (BULGARELLI et al., 2013), que será destinado para síntese de aminoácidos, clorofilas, DNA, RNA e outros compostos essenciais para a sobrevivência das plantas (HAYAT et al., 2010). Os aminoácidos formados são utilizados na síntese de proteínas e enzimas que participam de diversos processos

fisiológicos como, por exemplo, a fotossíntese, que por sua vez governa o crescimento e desenvolvimento da planta (KANT et al., 2011). Além disso, durante o estádio reprodutivo, o aumento da oferta de compostos nitrogenados favorece os processos de floração e enchimento de grãos contribuíndo para incrementos na produção das plantas (KANT et al., 2011).

Outra importante característica de espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* está relacionada à solubilização de fosfatos (WANI et al., 2007; TANK & SARAF, 2009). Os microrganismos solubilizadores de fosfatos contribuem para o aumento da fertilidade do solo pela capacidade de converter o fósforo insolúvel, presente na forma orgânica ou inorgânica, em fósforo solúvel, por meio da síntese de fosfatases, liberação de ácidos orgânicos, quelação e trocas iônicas (NARULA et al., 2000). O fósforo é essencial para a divisão celular e o metabolismo vegetal e atua em vários processos celulares como a geração de energia, síntese de ácidos nucléicos, ativação/desativação enzimática, reações redox, sinalização, entre outros (VANCE, 2003).

A promoção de crescimento das plantas por *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. também pode ser atribuída pela produção de ácido indol acético (JOSEPH et al., 2007; MA et al., 2012a). Os principais benefícios observados por este regulador de crescimento estão relacionados ao aumento do comprimento e volume da raiz além da formação de raízes laterais e pelos absorventes, resultando em maior área de superfície que permite maior absorção de água e nutrientes do solo pela raiz (SINGH et al., 2010; GLICK, 2012). Além disso, a absorção de AIA produzido pelas rizobactérias através das raízes contribui para um efeito fitoestimulatório no crescimento da planta (HUSSAIN & HASNAIN, 2011).

A produção de sideróforos como um mecanismo de promoção do crescimento vegetal tem sido verificada em membros dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* em uma série de estudos (WANI et al., 2007; WANI & KHAN, 2010). A excreção de sideróforos por estas bactérias rizosféricas pode estimular o crescimento das plantas tanto pelo aumento de ferro disponível para a nutrição (MASALHA et al., 2000) como pela indisponibilização deste nutriente para os fitopatógenos (AHMAD et al., 2008). Além da produção de sideróforos, espécies destes dois gêneros podem sintetizar compostos como o ácido cianídrico, fenazina, pirrolnitrina, 2,4-diacetil floroglucinol, pioluteorina, viscosinamida e tensina os quais possuem atividade antimicrobiana e conferem a estes microrganismos a capacidade de atuação como agentes de

biocontrole contra fitopatógenos (AHMAD et al., 2008; SHORESH et al., 2010). Os benefícios do biocontrole de fitopatógenos podem ser obsevados na redução de doenças radiculares e aumento de vigor da planta podendo resultar em incrementos no rendimento da cultura (KOKALIS-BURELLE et al., 2006).

Outra propriedade que tem sido identificada em *Bacilus* spp. e *Pseudomonas* spp. é a interferência na biossíntese de etileno pela expressão da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase (BARNAWAL et al., 2013; AHMAD et al., 2013). Estas bactérias atuam como drenos de ACC nas raízes dos hospedeiros limitando as respostas inibitórias do etileno sintetizado nos tecidos da planta, principalmente em condições de estresses (CHENG et al., 2012), contribuindo para o alongamento radicular e aumento da absorção de nutrientes, assim como para o maior crescimento da parte aérea. (GLICK, 2012)

A partição da massa seca entre os diferentes órgãos nas plantas de canola originadas de sementes microbiolizadas diferiu da testemunha em apenas alguns períodos do ciclo de desenvolvimento (Figura 16). De forma geral, as alterações mais marcantes estiveram relacionadas ao crescimento inicial; ao maior acúmulo de massa seca da raiz em DFs 320 aos 91 DAS e em DFs 320 e DFs 628 aos 105 DAS; e a redução da proporção da massa seca das folhas em virtude das diferenças de direcionamento dos assimilados às flores e síliquas em cada tratamento, durante parte do estádio reprodutivo (118 DAS aos 146 DAS). A alocação de assimilados entre os órgãos das plantas foi semelhante nos tratamentos de microbiolização e a testemunha na fase final do ciclo, aos 167 DAS (Figura 16K).

As diferenças na partição de fotoassimilados identificadas de forma mais marcante na fase inicial de crescimento das plantas de canola podem ser explicadas pela elevada taxa de multiplicação das bactérias inoculadas durante este período. Com o decorrer do experimento, o crescimento populacional dos isolados bacterianos pode ter sido reduzido, devido a possíveis condições limitantes do meio em que estes microrganismos estavam inseridos, como, por exemplo, a redução de nutrientes essenciais e do espaço físico ocupado. Ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta, a exsudação de uma ampla gama de compostos químicos pelas raízes modifica as propriedades químicas e físicas do solo, regulando, dessa forma, a estrutura da comunidade microbiana localizada em torno do sistema radicular (DAKORA & PHILLIPS, 2002). Além disso, esses exsudatos também promovem as interações simbióticas que são benéficas para o vegetal,

podendo estimular o crescimento e desenvolvimento deste em estádios pontuais do ciclo (NARDI et al., 2000).

Os tratamentos correspondentes ao isolados DFs 320, DFs 513 e DFs 628 promoveram efeitos positivos na produção de grãos das plantas de canola em relação à testemunha. Para os tratamentos com DFs 320 e DFs 513, uma tendência de aumento do número de síliquas e do número de grãos pode explicar o leve incremento da massa fresca do total de grãos produzidos por planta em relação à testemunha, embora não se tenham verificado diferenças estatísticas. Mesmo apresentando quantidade de grãos semelhante à testemunha, DFs 628 também resultou em tendência de incremento da massa fresca dos grãos por planta que pode ter ocorrido por uma tendência de aumento do número de síliquas e tamanho dos grãos (verificado pela massa seca de mil grãos). Estudo realizado com canola demonstrou aumento do número de grãos por síliqua e da massa de mil grãos pela microbiolização de sementes com *Azospirillum brasilense* (NOSHEEN et al., 2011)

Quanto à composição de ácidos graxos nos grãos coletados observou-se que o procedimento de microbiolização das sementes pode promover o crescimento das plantas de canola sem provocar alterações na qualidade do óleo obtido. Em todos os tratamentos foi verificada a predominância do ácido oleico (60%), em quantidade bastante similar à relatada na literatura em perfis de composição de ácidos graxos de óleo de canola. Em estudo realizado com três cultivares de canola (Libea, Sunday e Valesca) o conteúdo de ácido oleico compreendeu 61-66% do total de ácidos graxos do óleo extraído (NOVICKIENĖ et al., 2010). Além disso, a análise da composição de ácidos graxos do óleo de canola, obtido a partir de plantas provenientes de sementes microbiolizadas com *Azospirillum brasilense* e *Azotobacter vinelandii*, demonstrou conteúdo de ácido oleico de aproximadamente 55 e 59%, respectivamente (NOSHEEN et al., 2011).

De forma geral, os parâmetros do Teste JIP foram capazes de detectar modificações no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons nas plantas dos diferentes tratamentos. Embora tenham sido identificadas diferenças ocasionadas pela microbiolização nos parâmetros de fluorescência em relação à testemunha, não foi possível observar um comportamento padrão de alteração destes parâmetros nos diferentes ensaios realizados.

Deve-se destacar que o aparelho fotossintético das plantas é muito sensível aos estresses ambientais e que mesmo pequenas alterações na sua estrutura e no

seu funcionamento podem ser facilmente detectadas através da fluorescência da clorofila *a* (YUSUF et al., 2010). Sendo assim, as alterações nos parâmetros do Teste JIP observadas no presente estudo, evidenciando-se as reduções ocasionadas nos índices de performance por alguns tratamentos, podem estar associadas ao funcionamento do aparato fotossintético frente as mudanças climáticas pontuais que antecedem o período da coleta.

A diferenciação do comportamento verificada nos tratamentos pode estar relacionada à maior ou menor capacidade adquirida pela planta de tolerar as modificações nas condições climáticas, atribuída pelos benefícios associados a diversos mecanismos de ação característicos das bactérias inoculadas. Além disso, o desempenho de PGPR está relacionado aos fatores ambientais como a temperatura, umidade e presença de compostos químicos no solo, os quais podem afetar seu crescimento e a capacidade de exercer seu efeito sobre a planta (AHMAD et al., 2008).

Vários estudos têm demonstrado o aumento da vitalidade, crescimento e, em alguns casos, da produtividade de diferentes espécies de plantas pela aplicação de PGPR sob condições de alagamento (GRICHKO & GLICK, 2001), seca (ZAHIR et al., 2010), metais pesados (MA et al., 2011), salinidade (CHENG et al., 2007), baixas temperaturas (MURYOI et al., 2004) entre outros estresses.

As PGPR podem proteger as plantas dos efeitos deletérios ocasionados por estresses através dos diferentes mecanismos de promoção de crescimento como, por exemplo, a atividade da ACC deaminase produzida por algumas bactérias, que tem sido amplamente relatada em condições de crescimento adversas.

Neste contexto, alguns isolados bacterianos utilizados no presente estudo promoveram resultados positivos nos parâmetros do Teste JIP, demonstrando um melhor aproveitamento da energia absorvida pelos fotossistemas. Tal fato pode ser explicado, possivelmente, pelos efeitos benéficos destes microrganismos nas plantas de canola ocasionados através de mecanismos de ação distintos, os quais devem ser investigados e elucidados em pesquisas futuras.

Outro fator que pode explicar a variabilidade de respostas obtidas no presente estudo está relacionado à capacidade de colonização da rizosfera pelos isolados bacterianos utilizados. O estabelecimento bem sucedido e eficaz das bactérias introduzidas na rizosfera desempenha um papel central para a utilização de PGPR nas práticas agrícolas (BENIZRI et al., 2001) e para a verificação do sucesso da

inoculação, ou seja, a ocorrência dos benefícios ocasionados pela interação destes microrganismos e as plantas. Dessa forma, a colonização das raízes depende da capacidade de uma bactéria em se estabelecer nesse ambiente e competir com a microbiota nativa presente na rizosfera (BUDDRUS-SCHIEMANN et al., 2010). Deve-se salientar que o desempenho de alguns isolados bacterianos utilizados no presente estudo pode ter sido prejudicado pela competição com os microrganismos presente no solo utilizado, devido ao fato deste não ter sido submetido ao processo de esterilização. Segundo Kloepper et al. (1980), a variabilidade observada em estudos de inoculação de plantas com bactérias com o objetivo de se obter incrementos no rendimento é ocasionada provavelmente por falhas em introduzir a bactéria na rizosfera. Ainda, conforme o mesmo autor, fatores como a utilização de estirpes ineficazes, viabilidade da bactéria introduzida, tipo e temperatura do solo e constituição da comunidade microbiana nativa afetam a sobrevivência das bactérias, a colonização das raízes e a persistência na rizosfera.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo verificou-se que a fluorescência transiente da clorofila *a* pode ser utilizada nas avaliações das respostas fotossintéticas das plantas provenientes das sementes microbiolizadas com isolados bacterianos, sendo provavelmente mais eficaz em condições de crescimento totalmente controladas.

Este é um dos poucos trabalhos a analisar o efeito da microbiolização de sementes no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons gerando, portanto, resultados preliminares importantes. Contudo, são necessários mais estudos para se estabelecer os parâmetros mais responsivos que podem ser empregados para diagnosticar os efeitos da interação da planta e do microrganismo no aparelho fotossintético em processos de seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.

Além disso, estudos adicionais utilizando os isolados que promovem superioridade no crescimento às plantas de canola devem ser desenvolvidos a fim de elucidar detalhadamente os fenômenos pelos quais eles beneficiam a planta hospedeira, uma vez que um único isolado pode apresentar vários mecanismos de ação.

Estes isolados bacterianos poderão ser utilizados em ensaios futuros, em nível de campo, para verificação das interações entre estes microrganismos e outros membros da comunidade microbiana nativa da rizosfera, para que a inoculação seja

bem sucedida e possa ter impacto na produção da cultura. O monitoramento do comportamento destes isolados em função dos tratos culturais utilizados ao longo do ciclo da cultura poderá trazer informações sobre a capacidade de sobrevivência destes isolados no ambiente e avaliar possíveis mudanças na estrutura da comunidade bacteriana após o estabelecimento das estirpes.

Como perspectiva futura, a aplicação destes microrganismos como biofertilizantes ou agentes de biocontrole poderá reduzir a utilização de produtos químicos, um dos fatores responsável pelo encarecimento da produção, além de ser uma medida sustentável para o desenvolvimento de tecnologias mais limpas contribuindo para redução da contaminação ambiental.

6. CONCLUSÃO GERAL

A fluorescência transiente da clorofila *a* pode ser utilizada nas avaliações das respostas fotossintéticas das plantas provenientes das sementes microbiolizadas com isolados bacterianos, possibilitando a seleção de rizobactérias com potencial para incremento do crescimento de plantas de canola.

Isolados bacterianos apresentam potencial para promover o crescimento de plantas de canola quando utilizados por meio da microbiolização de sementes.

Os isolados bacterianos DFs 320, DFs 513 [*Pseudomonas veronii*] e DFs 628 [*Bacilus* sp.] promovem o maior crescimento das plantas de canola do híbrido Hyola 61.

7. REFERÊNCIAS

ABBASI, M.K.; SHARIF, S.; KAZMI, M.; SULTAN, T.; ASLAM, M. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. **Plant Biosystems**, v.145, p.159-168, 2011.

AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Effects of pesticides on plant growth promoting traits of *Mesorhizobium* strain MRC4. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.11, p.63-71, 2012a.

AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Productivity of greengram intebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.245-254, 2012b.

AHEMAD, M.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Remediation of herbicides contaminated soil using microbes. In: KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Eds.), **Microbes in Sustainable Agriculture**. New York: Nova Science Publishers, 2009.

AHEMAD, M.; MALIK, A. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. **Bacteriology Journal**, v.2, p.12-21, 2011.

AHMAD, E.; KHAN, M.S. ZAIDI, A. ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils. **Symbiosis**, v.61, p.93-104, 2013.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.

ANJUM, M.A.; SAJJAD, M.R.; AKHTAR, N.; QURESHI, M.A.; IQBAL, A.; JAMI, A.R.; HASSAN, M. Response of cotton to plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation under different levels of nitrogen. **Journal of Agricultural Research**, v.45, p.135-143, 2007.

ARANJUELO, I.; TCHERKEZ, G.; MOLERO, G.; GILARD, F.; AVICE, J.-C.; NOGUÉS, S. Concerted changes in N and C primary metabolism in alfalfa (*Medicago*

sativa) under water restriction. **Journal of Experimental Botany**, v.64, p.885-897, 2013.

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v.51, p.163-190, 2013.

BAI, Y.; ZHOU, X.; MITH, D.L. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strain with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Science**, v.43, p.1774-1781, 2003.

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

BARNAWAL, D.; DEEPAMALA, M.; BHARTI, N.; CHANOTIYA, C.S.; KALRA, A. ACC deaminase-containing *Bacillus subtilis* reduces stress ethylene-induced damage and improves mycorrhizal colonization and rhizobial nodulation in *Trigonella foenum-graecum* under drought stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, p.809-822, 2013.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.557-574, 2001.

BERTIN, C.; YANG, X.H.; WESTON, L.A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v.256, p.67-83, 2003.

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1327-1350, 2012.

BROWSE, J.; MCCOURT, P.; SOMERVILEE, C.R. Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. **Analytical Biochemistry**, v.152, p.141-146, 1986.

BUDDRUS-SCHIEMANN, K.; SCHMID, M.; SCHREINER, K.; WELZL, G.; HARTMANN, A. Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. **Microbial Ecology**, v.60, p.381-93, 2010.

BUKHOV, N.G.; EGOROVA, E.A.; GOVINDACHARY, S.; CARPENTIER, R. Changes in polyphasic chlorophyll *a* fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1657, p.121-130, 2004.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; THEMAAT, E.V.L. Van; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.807-838, 2013.

BUTKUTĖ, B.; ŠIDLAUSKAS, G.; BRAZAUSKIENĖ, I. Seed yield and quality oilseed rape as affected by nitrogen rates, sowing time, and fungicide aplication. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.37, p.2225-2744, 2006.

CAKMAKCI, R.; DONMEZ, F.; AYDIN, A.; SAHIN, F. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.1482-1487, 2006.

CALATAYUD, A.; BARRENO, E. Chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. **Environmental Pollution**, v.115, p.283-289, 2001.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. The Biology of *Brassica napus* L. (Canola/Rapeseed). **Plant Biosafety Office**, 2009. Acessado em 05 nov. 2013. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca./english/plaveg/bi/dir/dir9409e.pdf>.

CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; FEDOSEYENKO, D.; HAJIREZAEI, M.R.; BORRISS, R.; VON WIRÉN, N.V. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.174, p.3-11, 2011.

CASSOL, D.; SILVA F.S.P.; FALQUETO, A.R.; BACARIN, M.A. An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. **Photosynthetica**, v.46, p.634-636, 2008.

CHENG, Z.; PARK, E.; GLICK, B.R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. **Canadian Journal Microbiology**, v.53, p.912-918, 2007.

CHENG, Z.; WOODY, O.Z.; MCCONKEY, B.J.; GLICK, B. R. B. Combined effects of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and salinity stress on the *Brassica napus* proteome. **Applied Soil Ecology**, v.61, p. 255-263, 2012.

CHEN, Z.; MA, S.; LIU, L.L. Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. **Bioresource Technology**, v.99, p.6702-6707, 2008.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2011/2012**. Companhia Nacional de Abastecimento, 2012. Acessado em 05 nov. 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant Soil**, v.245, p.35-47, 2002.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística sem Matemática para psicologia**: usando SPSS para Windows. Porto Alegre: Artmed, 2006. 608p.

DASTAGER, S.G.; DEEPA, C.K.; PANDEY, A. Growth enhancement of black pepper (*Piper nigrum*) by a newly isolated *Bacillus tequilensis* NII-0943. **Biologia**, v.66, p.801-806, 2011.

DAYAN, F.E.; ZACCARO, M.L.M. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.102, p.189-197, 2012.

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.

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

DUYSENS, L.N.M.; SWEERS, H.E. Mechanisms of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: JAPANESE SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS (Ed.), **Studies on microalgae and photosynthetic bacteria, Special Issue of Plant and Cell Physiology**, Tokyo: University of Tokyo Press, p.353-372, 1963.

DWIVEDI, D.; JOHRI, B.N. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. **Current Science**, v.12, p.1693-1703, 2003.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v.36, p.184-189, 2007.

EHRENFELD, J.G.; RAVIT, B.; ELGERSMA, K. Feedback in the plant-soil system. **Annual Review of Environment and Resources**, v.30, p.75-115, 2005.

ENNAHLI, S; EARL, H.J. Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. **Crop Science**, v.45, p.2374-2382, 2005.

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S.B. de; LISBOA, B.B.; WENDISCH, V.F.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v.55, p.44-52, 2012.

FARZANA, Y.; RADIZAH, O. Influence of rhizobacterial inoculation on growth of the sweet potato cultivar. **On Line Journal of Biological Science**, v.1, p.176-179, 2005.

FARZANA, Y.; SAAD, R.O.S.; KAMARUZAMAN, S. Growth and storage root development of Sweet potato inoculated with rhizobacteria under glasshouse conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.3, p.1461-1466, 2009.

FIGUEIREDO FILHO, D.B.; SILVA JÚNIOR, J.A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v.18, 2009.

GAMA, V.N. Análises morfofisiológicas de plantas de pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) cultivadas em pleno sol e sombreamento natural. 90 p. Vitória: UFES. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2013.

GARSON, G.D. Statnotes: Topics in Multivariate Analysis, 2009. Acessado em 04 dez. 2013. Disponível em: <http://faculty.chass.ncsu.edu/garson/PA765/statnote.htm>.

GENE TECHNOLOGY REGULATOR. **The biology of *Brassica napus* L. (canola)**, 2008, 59p. Acessado em 04 nov. 2013. Disponível em: <http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/canola-3/$FILE/biologyca

nola08_2.pdf>.

GHOLAMI, A.; SHAHSAVANI, S.; NEZARAT, S. The effect of plant growth promoting rizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. **International Journal of Biological Life Sciences**, v.1, p.35-40, 2009.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v.251, p.1-7, 2005.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Hindawi Publishing Corporation**, v.2012, p.1-15, 2012.

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.

GRICHKO, V.P.; GLICK, B.R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.11-17, 2001.

GURURANI, M.A.; UPADHYAYA, C.P.; BASKAR, V.; VENKATESH, J.; NOOKARAJY, A.; PARK, S.W. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, p.245-258, 2013.

GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.G.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.206-211, 2001.

HAGHIGHI, B.J.; ALIZADEH, O.; FIROOZABADI, A.H. The role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sustainable agriculture. **Advances in Environmental Biology** v.5, p.3079-3083, 2011.

HARTHMANN, O.E.L.; MÓGOR, A.F.; WORDELL FILHO, J.A.; LUZ, W.C. da. Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. **Ciência Rural**, v.40, p.462-465, 2001.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals Microbiology**, v.60, p.579-598, 2010.

HAYAT, R.; ALI, S.; SIDDIQUE, M.T.; CHATHA, T.H. Biological nitrogen fixation of summer legumes and their residual effects on subsequent rainfed wheat yield. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.711-722, 2008.

HE, J.; AUSTIN, P.T; LEE, S.K. Effects of elevated root zone CO_2 and air temperature on photosynthetic gas exchange, nitrate uptake, and total reduced nitrogen content in aeroponically grown lettuce plants. **Journal of Experimental Botany**, v.61, p.3959-3969, 2010.

JAFARINIA, M.; SHARIATI, M. Effects of salt stress on photosystem II of canola plant (*Barassica napus* L.) probing by chlorophyll *a* fluorescence measurements. **Iranian Journal of Science & Technology**, v.A1, p.71-76, 2012.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; BARRAQUIO, W.L.; MATHAN, N.; LADHA, J.K. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: LADHA, J.K.; REDDY, P.M. (Eds.), **The quest for nitrogen fixation in rice**. Los Banõs: International Rice Research Institute, p.119-140, 2000.

JEONG, J.; GUERINOT, M.L. Homing in on iron homeostasis in plants. **Trends of Plant Science**, v.14, p.280-85, 2009.

JOLY, D.; JEMÂA, E.; CARPENTIER, R. Redox state of the photosynthetic electron transport chain in wild-type and mutant leaves of *Arabidopsis thaliana*: Impact on photosystem II fluorescence. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.98, p.180-187, 2010.

JOSEPH, B.; PATRA, R.R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Plant Production**, v.2, p.141-152, 2007.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.24-30, 1970.

KANG, B.G.; KIM, W.T.; YUN, H.S.; CHANG, S.C. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. **Plant Biotechnology Reports**, v.4, p.179-183, 2010.

KANT, S.; BI, Y.; ROTHSTEIN, S.J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.1499-1509, 2011.

KARAKURT, H.; KOTAN, R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. k*ütahya*). **Turkish Journal of Biology**, v.35, p.283-291, 2011.

KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.I.M.A.; KECSKES, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Boilogy and Biochemistry**, v.3, p.1229-1244, 2004.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A.; OVES, M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. **Environmental Chemistry Letters**, v.7, p.1-19, 2009.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.27, p.29-43, 2006.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N.; MILLER, T.D. Effecs of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Ecology and Epidemiology**, v.70, p.1078-1082, 1980.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: **Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**. Angers: INRA, v.2, p.879-882, 1978.

KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEOOER, J.W.; REDDY, M.S. Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. **Applied Soil Ecology**, v.31, p.91-100, 2006.

KOKALIS-BURELLE, N.; VAVRINA, C.S.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W. Amendment of muskmelon and watermelon transplant media with plant growth-

promoting rhizobacteria: effects on disease and nematode resistance. **Horticultural Technology**, v.13, p.476-48, 2003.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.; Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.

LINDERMANN, W.C.; GLOVER, C.R. Nitrogen fixation by legumes. **College of Agriculture, Consumer and Environmental Sciences**. Guide A-129, 4p., 2003.

LIU, F.; XING, S.; MA, H.; DU, Z.; MA, B. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.4617-4625, 2013.

LOPES, N.F.; MAESTRI, M. Análise de crescimento e conversão de energia solar em milho (*Zea mays* L.) em Viçosa, Minas Gerais. **Ceres**, v.20, p.189-201, 1973.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p.541-556, 2009.

LUZ, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.16-20, 2001a.

LUZ, W.C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.597-600, 2001b.

MARTINAZZO, E.G. Atividade fotossintética em plantas do gênero *Prunus*. 59 p. Pelotas: UFPel. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2011.

MARTTINEZ-ROMERO, E.; GUTIERREZ-ZAMORA, M.L.; ESTRADA, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; HERNANDEZ-LUCAS, I. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize. In: **Book of abstracts**, 17th North American conference on symbiotic nitrogen fixation, p.51, 2000.

MASALHA, J.; KOSEGARTEN, H.; ELMACI, O.; MENGEL, K. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.433-439, 2000.

MATHESIUS, U.; WATT, M. Rhizosphere signals for plant-microbe interactions: implications for field-grown plants. In: LÜTTGE, U.; BEYSCHLAG, W.; BÜDEL, B.; FRANCIS, D. (Eds.), **Progress in Botany**. Berlin: Springer-Verlag, v.72, p.125-161, 2011.

MATIRU, V.N.; DAKORA, F.D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**, v.3, p.1-7, 2004.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; LUO, Y.; FREITAS, H. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants-effects on plant growth and Ni uptake. **Journal of Hazardous Materials**, v.195, p.230-237, 2011a.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; VICENTE, J.A.; FREITAS, H. Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. **International Journal of Phytoremediation**, v.13, p.126-139, 2011b.

MURYOI, M.; SATO, M.; KANEKO, S.; KAWAHARA, H.; OBATA, H.; YAISH, M.W.; GRIFFITH, M.; GLICK, B.R. Cloning and expression of *afpA*, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.5661-5671, 2004.

NARDI, S.; CONCHERI, G.; PIZZEGHELLO, D.; STURARO, A.; RELLA, R.; PARVOLI, G. Soil organic matter mobilization by root exudates. **Chemosphere**, v.5, p.653-658, 2000.

NARULA, N.; KUMAR, V.; BEHL, R.K.; DUEBELL, A.A.; GRANSEE, A.; MERBACH, W. Effect of P solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P responsive wheat genotypes grown under green house conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.163, p.393-398, 2000.

NOSHEEN, A.; BANO, A.; ULLAH, F. Nutritive value of canola (*Brassica napus* L.) as affected by plant growth promoting rhizobacteria. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.113, p.1342-1346, 2011.

NOVICKIENĖ, L.; GAVELIENĖ, V.; MILIUVIENĖ, L.; KAZLAUSKIENĖ, D.; PAKALNIŠKYTĖ, L. Comparison of winter oilseed rape varieties: cold acclimation, seed yield and quality. **Žemdirbystė=Agriculture**, v.97, p.77-86, 2010.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial innoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**, v.13, p.415-424, 1995.

PAPAGEORGIOU, G.C.; GOVINDJEE (Eds.), Chlorophyll *a* Fluorescence: A signature of photosynthesis. **Advances in Photosynthesis and Respiration**, Dordrecht: Springer, v.19, 818 p., 2004.

PATEL, D.; JHA, C.K.; TANK, N.; SARAF, M. Growth enhancement of chickpea in saline soils using plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.31, p.53-62, 2012.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

PERES, J.R.R.; FRITAS JUNIOR, E. de; GAZZONI, D.L. Biocombustíveis: uma oportunidade para o agronegócio brasileiro. **Revista de Política Agrícola**, v.14, p.31-41, 2005.

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

RAJKUMAR, M.; AE, N.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v.28, p.142-149, 2010.

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v.321, p.305-339, 2009.

ROCHA, D.J.A.; MOURA, A.B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v.38, p.423-430, 2013.

ROHÁČEK, K.; BARTAK, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basics concepts, useful parameters, and some applications. **Photosynthetica**, v.37, p.339-363, 1999.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v.40, p.13-29. 2002.

RUBIO, L.M.; LUDDEN, P.W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, v.62, p.93-111, 2008.

RUIZ-VERA, U.M.; SIEBERS, M.; GRAY, S.B.; DRAG, D.W.; ROSENTHAL, D.M.; KIMBALL, B.A.; ORT, D.R.; BERNACCHI, C.J. Global warming can negate the expected CO_2 stimulation in photosynthesis and productivity for soybean grown in the midwestern United States. **Plant Physiology**, v.162, p.410-423, 2013.

SAHARAN, B.S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v.2011, p.1-30, 2011.

SALAMONE, I.E.G. de; HYNES, R.K.; NELSON, L.M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.404-11, 2001.

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.34, p.635-648, 2007.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. **Nature**, v.459, p.1071-78, 2009.

SANTOS, H.P. dos; TOMM, G.O.; BAIER, A.C. **Avaliação de germoplasmas de colza (*Brassica napus* L var. *oleifera*) padrão canola introduzidos no sul do Brasil, de 1993 a 1996, na Embrapa Trigo.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 10p. Acessado em 03 nov. 2013. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp05_canola_2007.pdf>.

SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX, A.J. The effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v.245, p.15-222, 2000.

SHAHAROONA, B.; ARAHAD, M.; KHALID, A. Differential response of etiolated pea seedlings to inoculation with rhizobacteria capable of utilizing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate or L-methionine. **The Journal of Microbiology**, v.45, p.15-20, 2007.

SHORESH, M.; HARMAM, G.E.; MASTOURI F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, v.48, p.21-43, 2010.

SILVEIRA, E. L. Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. 83 p. Jaboticabal: UNESP. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.

SINGH G.; BISWAS, D.R.; MARWAHA, T.S. Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum* L.): a hydroponics study under phytotron growth chamber. **Journal of Plant Nutrition**, v.33, p.1236-1251, 2010.

SOUZA JÚNIOR, I.T.; MOURA, A.B.; SCHAFER, J.T.; CORRÊA, B.O.; GOMES, C.B. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de

crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1259-1267, 2010.

SOUZA, R. de; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P.B. da; MEYER, J.; VARGAS, L.K., SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L.M.P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant Soil**, v.366, p.585-603, 2013.

SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R.J.; GOVINDJEE. Greening of peas: parallel measurements of 77 K emission spectra, OJIP chlorophyll a fluorescence, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. **Photosynthetica**, v.37, p.365-392, 1999.

STEARNS, J.C.; GLICK, B.R. Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. **Biotechnology Advances**, v.21, p.193-210, 2003.

STEFAN, M.; MIHASAN, M.; DUNCA, S. Plant growth promoting Rhizobacteria can inhibit the in vitro germination of *Glycine Max* L seeds. **Scientific Annals of "Alexandru Ioan Cuza" University Iasi**, Section Genetics and Molecular Biology, v.3, p.105-110, 2008.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. **Photosynthesis Research**, v.113, p.15-61, 2012.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP

fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.104, p.236-257, 2011.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v.61, p.32-42, 1995.

STRASSER, R.J. The grouping model of plant photosynthesis. In: AKOYUNOGLOU, G. (Ed.), **Chloroplast Development**. North Holland: Elsevier, p.513-524, 1978.

SUDHAKAR, P.; CHATTOPADHYAY, G.N.; GANGWAR, S.K.; GHOSH, J.K. Effect of foliar application of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). **Journal of Agricultural Science**, v.134, p.227-234, 2000.

TANK, N.; SARAF, M. Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR. **Journal of Basic Microbiology**, v.49, p.195-204, 2009.

TEIXEIRA, D.A.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; FERREIRA, E.M.; SIQUEIRA, L.D.; LUIZ, A.; MAFFIA, L.A.; MOUNTEER, A.H. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.118-123, 2007.

TILAK, K.V.B.R.; SAXENA, A.K. Azospirillum - Its impact on crop production. In: YADAV, A.K.; MOTSARA, M.R.; CHAUDURI, S. (Eds.), **Recent Advances in Biofertilizer Technology**. New Delhi: Society for Promotion & Utilization of Resources and Technology, p.176-189, 2001.

TOMM, G.O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007, 42p. Acessado em 05 nov. 2013. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp03_2007.pdf>.

TOMM, G.O. **Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005, 21p. Acessado em 04 nov. 2013. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp26.htm>.

TOMM, G.O.; WIETHÖLTER, S.; DALMAGO, G.A.; SANTOS, H. P. **Tecnologia para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009, 88p. Acessado em 05 nov. 2013. Disponível em: <http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00051890.pdf>.

TRAN VÂN, V.; BERGE, O.; KE, S.N.; BALANDREAU, J.; HEULIN, T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, v.218, p.273-284, 2000.

TRISSL, H.-W.; GAO, Y.; WULF, K. Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of photosystem II by an exciton-radical pair equilibrium. **Biophysical Journal**, v.64, p.974-988, 1993.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; EGGENBERG, P.; BIRO, B.; KÖVES-PECHY, K.; VÖRÖS, I.; STRASSER, R.J. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.169-182, 2000.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R.J. In vivo assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of mycorrhization on host plants. In: VARMA, A. (Ed.), **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics**. Dordrecht: Springer, p.679-703, 2008.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R.J. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. **Photosynthesis Research**, v.117, p.289-320, 2013.

VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v.157, p.423-447, 2003.

VANSUYT, G.; ROBIN, A.; BRIAT, J.F.; CURIE, C.; LEMANCEAU, P. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.20, p.441-7, 2007.

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

VIKRAM, A.; HAMZEHZARGHANI, H. Effect of phosphate solubilizing bacteria on nodulation and growth parameters of greengram (*Vigna radiate* L. Wilczec). **Research Jounal of Microbiology**, v.3, p.62-72, 2008.

WANI, P.A.; KHAN, M.S. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer* arietinumL.) in chromium stressed soils. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.3262-3267, 2010.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.170, p.283-287, 2007.

WEYENS, N.; LELIE, D.V.D.; TAGHAVI, S.; NEWMAN, L.; VANGRONSVELD, J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends Biotechnol**, v.27, p.591-598, 2009.

ZAFAR-UL-HYE, M.; ZAHIR, Z.A.; SHAHZAD, S.M.; NAVEED, M.; ARSHAD, M.; KHALID, M. Preliminary screening of rhizobacteria containing ACC-deaminase for promoting growth of lentil seedlings under axenic conditions. **Pakistan Journal of Botany**, v.39, p.1725-1738, 2007.

ZAHIR, Z.A.; MUNIR, A.; ASGHAR, H.N.; SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.958-963, 2008.

ZAHIR, Z.A.; SHAH, M.K.; NAVEED, M.; AKHTER, M.J. Substratedependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.1288-1294, 2010.

ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; AHEMAD, M.; OVES, M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.56, p.263-284, 2009.

ZHANG, J.; LIU, J. Photosynthetic characteristics for Mongolian Scots Pine plantation and its relation with environmental factors. **Advanced Materials Research**, v.393, p.1334-1340, 2012.

ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.J.; KLOEPPER, J.W. Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.39-50, 2001.

YUSUF, M.M.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1797, p.1428-1438, 2010.

ANEXO A

Tabela 1A. Dados meteorológicos do período correspondente à realização do Ensaio I (01 de junho a 27 de julho de 2012)

Elementos	Dados meteorológicos (01/06 a 27/07/2012)
Temperatura média (°C)	11,4
Temperatura média das mínimas (°C)	6,5
Temperatura mínima absoluta (°C)	-3,0
Temperatura média das máximas (°C)	18,2
Temperatura máxima absoluta (°C)	30,0
Insolação média (h)	6,0
Radiação solar (cal cm^{-2} dia^{-1})	207,5
Número de dias de geada	15

Fonte: Estação Agroclimatológica de Pelotas - Convênio EMBRAPA/UFPEL

ANEXO B

Tabela 1B. Dados meteorológicos do período correspondente à realização da Etapa I do Ensaio II (14 de agosto a 30 de outubro de 2012)

Elementos	Dados climatológicos (14/08 a 30/10/2012)
Temperatura média (°C)	17,5
Temperatura média das mínimas (°C)	13,8
Temperatura mínima absoluta (°C)	5,1
Temperatura média das máximas (°C)	22,6
Temperatura máxima absoluta (°C)	30,5
Insolação média (h)	5,7
Radiação solar (cal cm^{-2} dia^{-1})	308,9
Número de dias de geada	-

Fonte: Estação Agroclimatológica de Pelotas - Convênio EMBRAPA/UFPEL

ANEXO C

Tabela 1C. Dados meteorológicos do período correspondente à realização da Etapa II do Ensaio II (20 de março a 30 de abril de 2013)

Elementos	Dados climatológicos (20/03 a 30/04/2013)
Temperatura média (°C)	18,9
Temperatura média das mínimas (°C)	14,2
Temperatura mínima absoluta (°C)	7,3
Temperatura média das máximas (°C)	25,2
Temperatura máxima absoluta (°C)	30,7
Insolação média (h)	7,6
Radiação solar (cal cm^{-2} dia^{-1})	352,5
Número de dias de geada	-

Fonte: Estação Agroclimatológica de Pelotas - Convênio EMBRAPA/UFPEL

ANEXO D

Tabela 1D. Dados meteorológicos do período correspondente à realização do Ensaio III (08 de maio a 21 de outubro de 2013)

Período (DAS)*	T (°C)	Tm (°C)	TmA (°C)	TM (°C)	TMA (°C)	I (h)	RS (cal cm^{-2} dia^{-1})	DG (DAS)*
0-20	14,3	10,0	2,5	20,6	26,2	5,5	214,6	2-9-10
21-34	12,9	8,4	4,6	19,8	24,5	6,9	225,1	30
35-49	12,4	8,3	3,8	17,7	24,6	4,8	176,4	38
50-62	12,6	7,9	2,3	18,7	22,8	5,5	193,0	54-55
63-76	11,3	7,7	2,1	16,9	27,4	5,3	197,8	69-73-75
77-90	11,1	6,6	-1,0	18,0	25,8	7,0	250,8	77-78-79-89
91-104	10,7	5,8	0,6	16,7	23,2	5,3	237,2	95-96-99-100-102
105-117	12,3	8,1	4,5	17,8	25,4	3,9	213,1	112
118-131	18,3	13,2	4,3	24,0	34,7	6,3	309,5	119
132-145	13,3	9,5	5,3	17,9	20,6	4,6	283,4	-
146-166	17,5	13,5	7,0	22,3	30,2	6,8	383,8	-

T = temperatura média; Tm = temperatura média das mínimas; TmA = temperatura mínima absoluta; TM = temperatura média das máximas; TMA = temperatura máxima absoluta; I = insolação média; RS = radiação solar; e DG = dias de geada. *DAS: dias após a semeadura
Fonte: Estação Agroclimatológica de Pelotas - Convênio EMBRAPA/UFPEL