



Instituto Latino-Americano de Ciências da  
Vida e da Natureza (ILACVN)

Ciências Biológicas – Ecologia e  
Biodiversidade

**INTERAÇÃO DE *Ilex paraguariensis* COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS**

**KAREN CRISTINE GONÇALVES DOS SANTOS**

FOZ DO IGUAÇU

2015



Instituto Latino-Americano de Ciências  
da Vida e da Natureza (ILACVN)

Ciências Biológicas – Ecologia e  
Biodiversidade

## **INTERAÇÃO DE *Ilex paraguariensis* COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS**

**KAREN CRISTINE GONÇALVES DOS SANTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas

FOZ DO IGUAÇU

2015

KAREN CRISTINE GONÇALVES DOS SANTOS

**INTERAÇÃO DE *Ilex paraguariensis* COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas  
UNILA

---

Profª. Drª. Giovana Secretti Vendruscolo  
UNILA

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Pereira  
UNILA

Foz do Iguaçu, 8 de dezembro de 2015.

## **Agradecimentos**

Agradeço minha mãe por sempre ter me apoiado e me entendido, mesmo nos momentos mais difíceis, sua força é o modelo no qual me espelho.

Agradeço meus irmãos por me fazerem rir e por expressarem seu orgulho por meu sucesso até aqui. Também agradeço meu sobrinho, essa pessoinha linda que me acompanha desde o início da graduação.

Agradeço meus amigos, Açucena, Jannie, Juliane, Beatriz, Cecílio, por rirem e chorarem comigo e por me fazerem tirar a cara dos livros pela vontade de bater em vocês pelas burradas que vocês fazem.

Agradeço o viveiro Los Pinos, Argentina, por doar as plantas usadas neste estudo e cuidá-las entre a inoculação e a avaliação do crescimento. A Fundação Rojas, por financiar viagens para apresentação de trabalhos, aprendizagem de técnicas em outros laboratórios e realização de experimentos. A Patrícia do INTA e todo o pessoal do GIGA de Posadas, por me receberem e me ensinarem. A Leila, a Lucia e o Diego, por me fazerem rir durante viagens, experimentos e lavagens de frutos. O Cleto, pela co-orientação e ajuda em estatística e português.

Agradeço algumas pessoas que me ajudaram a ir além e alcançar meus sonhos. Aline, por me animar no primeiro ano da faculdade, dando-me vontade de seguir a vida acadêmica. Cristian, por me ajudar a ver que biologia molecular é linda. Paula, por me avisar sobre uma oportunidade de estágio que me fez conquistar uma nova vida incrível. A todos os professores que já me tiveram como aluna. A todos que passaram pela minha vida durante a graduação, me ensinando que existem pessoas muito boas e pessoas muito ruins nesse mundo.

Por fim, agradeço meu porto seguro, meu melhor amigo, meu confidente, meu companheiro. Obrigada, Ale, por tornar esse caminho tão mais fácil de se percorrer.

“Queria te agradecer por não desistir de eu me tornar uma bióloga (essa coisa linda de ser). Hoje eu entendo sua empolgação com os estudos e o seu desânimo quando eu quase segui outra área, o que teria sido um grande erro e você foi a única que me incentivou a não cometê-lo.”

Dedicatória de uma grande amiga.

GONÇALVES, Karen Cristine dos Santos. **Interação de *Ilex paraguariensis* com microrganismos benéficos.** 2015. 44p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu, 2015.

## RESUMO

A erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) é uma planta muito importante para vários países da América do Sul, entretanto seu cultivo, realizado principalmente por pequenos e médios agricultores, apresenta diversos problemas, dentre eles a necessidade de ser iniciado com plântulas vigorosas. Buscando a solução deste problema, nesta pesquisa foram inoculadas plântulas de *I. paraguariensis* com três microrganismos promotores de crescimento vegetal com diferentes estilos de vida e características biológicas: a bactéria diazotrófica e de vida livre *Azospirillum brasilense*, a bactéria diazotrófica endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* e o fungo micoparasítico *Trichoderma harzianum*. Foram inoculadas 50 plantas por tratamento submergindo as raízes em água ou no inóculo microbiano por 15 minutos. O crescimento vegetal foi avaliado 150 dias após a inoculação aferindo-se o comprimento e a massa fresca das plantas inteiras e separadamente dos sistemas radicular e aéreo. A homogeneidade das variâncias foi verificada com o teste Levene<sup>2</sup> e os tratamentos foram comparados com o teste ANOVA, ambos foram realizados com o software OriginPro 8.6. Foi verificado que, mesmo que os três microrganismos supracitados sejam considerados benéficos, a promoção de crescimento vegetal foi visualizada somente nas plantas inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus*. É possível que a erva-mate seja seletiva em relação aos organismos com os quais interage, já que os organismos aqui estudados já foram registrados em interações benéficas com diversas plantas filogeneticamente distantes. Além disso, a bactéria *G. diazotrophicus* pode ter desenvolvido uma interação mais íntima com as plântulas por ter um caráter endofítico obrigatório, assim a bactéria pode crescer melhor pela menor competição com microrganismos e a planta pode aproveitar mais os nutrientes e os reguladores de crescimento vegetal secretados pela bactéria. A descoberta da promoção de crescimento de *I. paraguariensis* sem o uso de fertilizantes químicos representa um grande avanço na pesquisa desta planta, entretanto ainda é necessário compreender os mecanismos que promovem tanto a interação quanto o crescimento da erva-mate nessa relação mutualística com *G. diazotrophicus*. Para iniciar essa investigação, busca-se no futuro avaliar o papel da fixação de nitrogênio e da síntese de auxinas por *G. diazotrophicus* no crescimento de *I. paraguariensis*.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*. *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Endofíticos. Promoção de crescimento vegetal.

GONÇALVES, Karen Cristine dos Santos. **Interaction of *Ilex paraguariensis* with beneficial microorganisms.** 2015. 44p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu, 2015.

### ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) is a very important plant for several countries of South America, however its culture, made mostly by small and medium farmers, shows many problems, among them is the necessity of initiating it with vigorous seedlings. Seeking for a solution to this problem, in this research we inoculated seedlings of *I. paraguariensis* with three plant growth-promoting microorganisms of different lifestyles and biological features: the diazotroph and free-living bacterium *Azospirillum brasilense*, the diazotroph and endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the mycoparasite fungus *Trichoderma harzianum*. We inoculated 50 plants by treatment sinking the roots in water (control) or in the microbial inoculum for 15 minutes. We evaluated the plant growth 150 days after the inoculation by measuring the length and fresh weight of the whole plants and separately of the root and shoot systems. We verified the homogeneity of the variances with Levene<sup>2</sup> test and we compared the treatments with ANOVA test, both with the software OriginPro 8.6. We verified that, although the three organisms aforementioned are considered beneficial organisms, the plant growth promotion was visualized only in those plants inoculated with the bacterium *G. diazotrophicus*. It is possible that *I. paraguariensis* is selective in relation to the organisms with which it interacts, since all the microorganisms here studied have been registered in beneficial interaction with several plants phylogenetically distant. Furthermore, the bacterium *G. diazotrophicus* may have developed a more intimate interaction with the seedlings for having an obligate endophytic character, so the bacterium population could grow better for the lower competition with microorganisms and the plant could utilize more of the nutrients and plant growth regulators secreted by the bacterium. Finding the growth promotion of *I. paraguariensis* without the use of chemical fertilizers represents a great advance in the research of this plant, however it is still necessary to comprehend the mechanisms that promote both the interaction and the growth of the *I. paraguariensis* in this mutualistic relation with *G. diazotrophicus*. To initiate this investigation, we seek in the future to evaluate the role of the nitrogen fixation and the synthesis of auxins by *G. diazotrophicus* in the growth of *I. paraguariensis*.

**Key words:** *Ilex paraguariensis*. *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Endophytics. Plant-growth promotion.

## Lista de Figuras

- Figura 1. *Ilex paraguariensis*. A1: inflorescência; A2: flor; A3: fruto; A4: cuia (mate) e bomba para consumo da infusão (Fonte: Bermejo & León (1994))..... 17
- Figura 2. Área de distribuição natural de *Ilex paraguariensis*, demarcada por união de pontos de máxima amplitude de ocorrência da espécie (De Oliveira & Rotta 1983).  
..... 18
- Figura 3. Plantas de um mês pós-germinação em sementeira. ....~~3536~~
- Figura 4. Sistema de inoculação de plantas.....~~3536~~
- Figura 5. Distribuição de plântulas no viveiro (quatro meses pós-inoculação).....~~3637~~
- Figura 6. Plântula de erva-mate com folha infectada com ampola da erva-mate (*Gyropsylla spegazzianiana*). Círculo vermelho indicando ampola com ovos do inseto.....~~3738~~
- Figura 7. Box plot do comprimento e da massa fresca total dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle). Quadrados indicam a média e “x” indicam posição do 1% e do 99% dos espécimes amostrados. ....~~3839~~
- Figura 8. Box plot do comprimento e da massa fresca radicular dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle). Quadrados indicam a média e “x” indicam posição do 1% e do 99% dos espécimes amostrados. ....~~3940~~
- Figura 9. Box plot do comprimento e da massa fresca aérea dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*)



e CT (inoculação com água, controle). Quadrados indicam a média e "x" indicam posição do 1% e do 99% dos espécimes amostrados. ....3940

Figura 10. Box plot da razão entre comprimento aéreo e comprimento radicular e razão entre massa fresca aérea e massa fresca radicular dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle). Quadrados indicam a média e "x" indicam posição do 1% e do 99% dos espécimes amostrados. ....3941

Figura 11. Média da razão entre comprimento aéreo e comprimento radicular e razão entre massa fresca aérea e massa fresca radicular dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre as médias. ANOVA para massa fresca: F=4,14, p=0,007. ....4044

Figura 12. Plântulas de *Ilex paraguariensis* cinco meses após inoculação com água (controle, A e B) *Azospirillum brasilense* (C e D), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (E e F), *Trichoderma harzianum* (G e H).....4142

Figura 13. Média do comprimento total, radicular e aéreo de plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* (AB), com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GD), *Trichoderma harzianum* (TH) e das plantas controle não inoculadas (CT). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. (Comprimento total: F=11,62, p<0,001; Comprimento radicular: F=5,15, p=0,002; Comprimento aéreo: F=8,39, p=<0,001).....4243

Figura 14. Média da massa fresca total, radicular e aérea de plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* (AB), com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GD), *Trichoderma harzianum* (TH) e das plantas controle não inoculadas (CT). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. (Massa fresca total: F=12,

p<0,001; Massa fresca radicular: F=11,6, p<0,001; Massa fresca aérea: F=10,62,  
p<0,001).....4243

## SUMÁRIO

Agradecimentos .....	3
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
Lista de Figuras .....	7
Fundamentação teórica .....	<del>12</del> <u>14</u>
Objetivos .....	<del>14</del> <u>13</u>
Objetivo geral .....	<del>14</del> <u>13</u>
Objetivos específicos .....	<del>14</del> <u>13</u>
Revisão bibliográfica .....	<del>15</del> <u>14</u>
Características de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	<del>15</del> <u>14</u>
Consumo e cultivo da erva-mate ( <i>I. paraguariensis</i> ) .....	<del>18</del> <u>16</u>
Características químicas da erva-mate ( <i>I. paraguariensis</i> ) .....	<del>20</del> <u>18</u>
Problemas na Produção da Erva-mate ( <i>I. paraguariensis</i> ) .....	<del>22</del> <u>20</u>
Microrganismos promotores de crescimento vegetal .....	<del>24</del> <u>22</u>
Justificativa .....	<del>32</del> <u>30</u>
Materiais e Métodos .....	<del>33</del> <u>34</u>
Material biológico .....	<del>33</del> <u>34</u>
Análise de crescimento .....	<del>36</del> <u>34</u>
Resultados e Discussão .....	<del>38</del> <u>36</u>

Considerações Finais .....	<u>4543</u>
Referências bibliográficas.....	<u>4644</u>
Anexos.....	<u>5452</u>

## Fundamentação teórica

Espécies vegetais cultiváveis pouco melhoradas geneticamente pelo homem apresentam características selvagens. Algumas destas, apesar de serem muito importantes para a sobrevivência dessas espécies em ambientes nativos, não são desejáveis a seu cultivo. Dentre essas espécies encontra-se a erva-mate. Poucos e recentes são os programas de melhoramento genético desta espécie. Os programas em andamento são o da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) (FLOSS, 1997), o da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (STURION & DE RESENDE, 1997) e o do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), na Argentina (BELINGHERI & PRAT KRICUN, 1997).

Dentre as características selvagens indesejáveis ao cultivo da erva-mate encontram-se a desuniformidade e a lentidão de sua germinação, acompanhadas da baixa viabilidade de suas sementes (BURTNIK, 2003). Estes problemas dificultam grandemente a produção de mudas, que são sensíveis e precisam crescer vigorosas para que haja sucesso na implantação dos ervais. Por fim, ervais com mais de dez anos apresentam declínio da produtividade, obrigando os ervateiros a fazer uso de fertilizantes. Entre eles, os mais necessários são aqueles nitrogenados, visto que o nitrogênio é o elemento que mais limita a produtividade vegetal.

Mesmo que o nitrogênio seja o elemento mais abundante da atmosfera, sua forma gasosa não está diretamente disponível para os organismos vivos (MARIN *et al.*, 1999). Pela alta estabilidade da molécula de dinitrogênio presente na atmosfera, há um alto custo energético e, portanto, monetário, para a sua redução industrial à amônia. Este fato, aliado aos prejuízos ambientais do uso excessivo de fertilizantes químicos nitrogenados, torna atraente a ideia da utilização de processos naturais de fixação de nitrogênio para a fertilização de cultivos. A fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por organismos procariotos, é o principal processo responsável pela inserção do nitrogênio no *pool* disponível para a maior parte dos

seres vivos, fixando aproximadamente  $171 \times 10^{12}$  g por ano de nitrogênio (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os benefícios da fixação biológica de nitrogênio são resultados da interação entre plantas e bactérias na rizosfera: os compostos exsudados pelas plantas no solo são aproveitados pelas bactérias para seu crescimento, enquanto a liberação de nitrogênio reduzido pela bactéria induz o crescimento das plantas. As plantas da família Fabaceae interagem intimamente com bactérias da família Rhizobiaceae, fixadoras de nitrogênio. Nesta interação simbiótica, tanto a bactéria quanto a planta liberam compostos no solo de modo a atrair um ao outro. Então a bactéria penetra a raiz da planta e se aloja no interior de células do córtex radicular, enquanto a planta estimula a divisão de células dessa região de modo a formar uma estrutura (o nódulo) com proteção contra o excesso de oxigênio, que inibe o funcionamento da enzima responsável pela quebra do dinitrogênio ( $N_2$ ), a nitrogenase. Outros grupos, como as gramíneas, interagem com bactérias fixadoras de nitrogênio, mas não ocorre a formação de estruturas específicas na planta. Este tipo de interação é chamado associativo (PELCZAR, 1997). Além da redução do dinitrogênio, muitas dessas bactérias são capazes de sintetizar e secretar hormônios vegetais, induzindo o crescimento vegetal por mecanismos distintos (CASSÁN *et al.*, 2015).

## Objetivos

### OBJETIVO GERAL

Avaliar se microrganismos promotores de crescimento vegetal são capazes de induzir o crescimento de *Ilex paraguariensis*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da inoculação de *Ilex paraguariensis* com a bactéria *Azospirillum brasilense* nos parâmetros comprimento e massa fresca radiculares, aéreos e totais.
2. Avaliar o efeito da inoculação de *I. paraguariensis* com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* nos parâmetros comprimento e massa fresca radiculares, aéreos e totais.
3. Avaliar o efeito da inoculação de *I. paraguariensis* com o fungo *Trichoderma harzianum* nos parâmetros comprimento e massa fresca radiculares, aéreos e totais.

## Revisão bibliográfica

### CARACTERÍSTICAS DE *ILEX PARAGUARIENSIS*

A erva-mate, descrita por Auguste de Saint Hilaire em 1822 como *Ilex paraguariensis*, é uma das 68 espécies do gênero *Ilex* presentes no Brasil (WINGE, 1997). Os gêneros *Ilex*, *Nemopanthus* Raf. e *Prinos* compreendem a família Aquifoliaceae (Ordem Aquifoliales, Superordem Asteranae) (LIST, 2010). Hoje o único gênero existente é *Ilex*, com 600 espécies (LOIZEAU *et al.*, 2005). Esta família é composta de pequenas árvores ou arbustos geralmente sempre verdes e dioicas (WATSON & DALLWITZ, 1992). As folhas costumam ser dentadas e alternadas e as flores são pequenas, brancas, tetrâmeras e actinomorfas, ou seja, com simetria radial (BOTANY, 2011). O ovário é súpero e sincárpico e a placentação é axial-basal, tornando-se livre e central. As flores masculinas apresentam pistilódios e as femininas apresentam estaminódios (PORTUGAL). Os frutos são drupas, vermelhas, violetas ou quase pretas, com um a sete pirenos (BOTANY, 2011; GROppo, 2009; WATSON & DALLWITZ, 1992). O gênero *Ilex* está disperso pelo mundo inteiro, como é possível ver na análise filogenética de CUÉNOUD *et al.* (2000) e na avaliação da distribuição geográfica do gênero feita por LOIZEAU *et al.* (2005).

*I. paraguariensis*, a erva-mate, ocupa naturalmente o estrato médio das florestas, assumindo hábito arbóreo. Não há consenso na literatura sobre a altura que a erva-mate pode alcançar, alguns autores citam entre 8 e 15 metros de altura (BRACESCO *et al.*, 2011; CANTO, 2007; DELLACASSA & BANDONI, 2001) e outros entre 12 e 30 metros de altura (HECK & DE MEJIA, 2007; WINGE, 1997). As folhas são obovadas com base cuneada (DELLACASSA & BANDONI, 2001), alternadas com bordas dentadas, com comprimento entre 8 e 10 centímetros, largura entre 4 e 5 centímetros (Figura 1) e coloração verde-escura na face adaxial e verde clara na face abaxial (EFING, 2008). As árvores são dioicas e, de acordo com o estudo de STURION *et al.* (2000), apresentam uma proporção de proporção de 63% de plantas masculinas e 37% de plantas femininas. Elas florescem entre outubro e dezembro, sendo suas flores brancas, pequenas e unissexuais. Os frutos são violeta escuro ao amadurecer, entre janeiro e março, e apresentam quatro ou cinco sementes



(BERMEJO & LÉON, 1994), as quais são disseminadas por pássaros (DELLACASSA & BANDONI, 2001; EFING, 2008; LORENZI, 2008). Segundo DE OLIVEIRA & ROTTA (1983), os indivíduos desta espécie se distribuem entre as latitudes 21°S e 30°S, as longitudes 48°30'W e 56°10'W e altitudes entre 500 e 1000 metros (Figura 2), ocupando 3% do território sul americano (Brasil, leste do Paraguai e nordeste da Argentina) e 5% do território brasileiro (Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo). De acordo com LORENZI (2008), a espécie é característica e preferente das mata de pinhais dos estados sulinos brasileiros, sendo rara em outras áreas de Mata Atlântica ou em mata ciliar. Além disso, manchas de ervais nativos também ocorrem no Uruguai (CASCALES *et al.*, 2014).

Figura 1. *Ilex paraguariensis*. A1: inflorescência; A2: flor; A3: fruto; A4: cuia (mate) e bomba para consumo da infusão (Fonte: Bermejo & León (1994)).

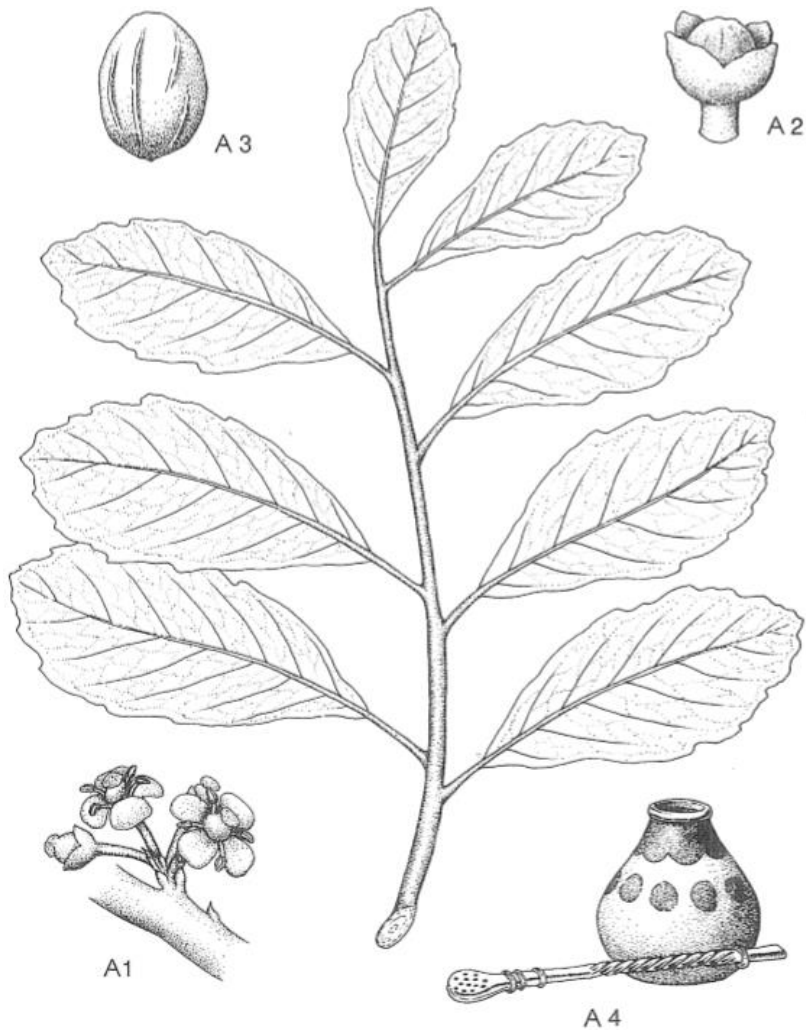
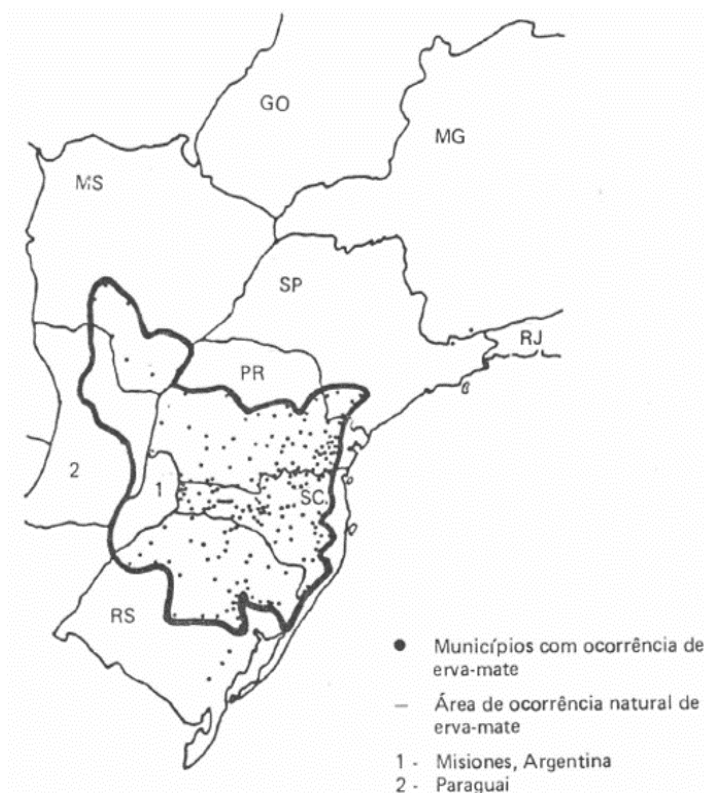


Figura 2. Área de distribuição natural de *Ilex paraguariensis*, demarcada por união de pontos de máxima amplitude de ocorrência da espécie (De Oliveira & Rotta 1983).



#### CONSUMO E CULTIVO DA ERVA-MATE (*I. PARAGUARIENSIS*)

O consumo intenso de infusões feitas a partir da erva na região de ocorrência natural remonta a centenas de anos, às culturas indígenas Guarani e Caingangue (BOGUSZEWSKI, 2007), e foi propagado pelos jesuítas, os quais desenvolveram o cultivo da erva-mate e o utilizaram como base econômica de seu sistema em Misiones no Paraguai, no nordeste da Argentina e no Rio grande do sul (DELLACASSA & BANDONI, 2001). Apesar de atualmente a erva ter uma importância majoritariamente cultural na região, sua participação na história e na economia foi

grande, um exemplo é o atual estado do Paraná, onde a mecanização do processo produtivo dos engenhos, nos quais se realizava o beneficiamento da erva-mate, foi o princípio de atividade industrial do estado (BONDARIK *et al.*, 2006). Segundo estes autores, o governo português mostrou interesse pela extração da erva no século XVIII, iniciando assim esta atividade nos ervais nativos da região do Paraná e, posteriormente, em Santa Catarina, suprindo então as demandas da Argentina, do Uruguai e do Chile. A atividade ervateira foi o principal produto paranaense entre a sua emancipação política, em 1853, e a crise econômica de 1929 (COELHO *et al.*, 2001), sendo responsável pela constituição econômica e cultural do estado e pelo estabelecimento de Curitiba como polo econômico (BONDARIK *et al.*, 2006). Ainda hoje, sua participação na economia do estado é grande, sendo que em 2011 ela foi responsável por 80% da receita dos produtos florestais não madeireiros, equivalente a R\$138 milhões (SEAB, 2013).

O cultivo da erva-mate somente se realiza no Brasil, na Argentina e no Paraguai (RESENDE *et al.*, 2000), os quais produziram em média, entre 2002 e 2012, 453.295, 266.909,13 e 87.253,91 toneladas de erva-mate, respectivamente (FAOSTAT). Este cultivo é um dos sistemas agroflorestais mais antigos da região sul brasileira, e a produção em 2012 em ervais cultivados no Brasil foi de 513.256 toneladas numa área de 76.172 hectares, tendo o Rio Grande do Sul e o Paraná produzido 50,8% e 35,2% desse total. Com relação ao extrativismo, produziu-se no Brasil 229.681 toneladas de erva-mate em 2011 e o Paraná sozinho foi responsável por 73,8% dessa produção (SEAB, 2013). Neste estado, a produção da erva-mate ocorre em 151 municípios. De acordo com HECK & DE MEJIA (2007), a produção de erva-mate é realizada principalmente por extrativismo de ervais nativos, sistemas mistos (ervais nativos combinados a práticas de cultivo, com substituição de plantas quando sua produtividade começa a cair) e cultivo em monocultura, sendo que os dois primeiros sistemas são encontrados no Brasil e o terceiro se iniciou na Argentina em 1915. Apesar da crença comum de que plantas de que *I. paraguariensis* cultivada em monocultura apresenta sabor mais amargo do que aquelas dos ervais nativos, RAKOCEVIC *et al.* (2008) encontraram que o gosto amargo da erva-mate é afetado pela temperatura da folha, pela transpiração, pela fotossíntese e pelo sexo, sendo que

folhas sombreadas e plantas femininas apresentam sabor mais amargo que folhas não-sombreadas e plantas masculinas, respectivamente.

#### CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA ERVA-MATE (*I. PARAGUARIENSIS*)

A utilização de *Ilex paraguariensis* é muito variada, mas seu uso principal continua sendo o preparo de infusões, como chimarrão, tereré, chá mate e mate cozido. Além disso, ela é usada em bebidas como vinho, cerveja ou refrigerante, como insumo de alimentos, em medicamentos estimulantes ou para o tratamento de hipertensão, bronquite e pneumonia, em produtos de higiene geral e pessoal e em cosméticos (SEAB Paraná, 1997 *apud* Cardoso Jr, 2006). Esta grande amplitude de aproveitamento, que atraiu o interesse de diversos países do hemisfério norte (VALDUGA *et al.*, 1997), se deve à presença de importantes compostos químicos, do ponto de vista econômico, nutricional e medicinal, nesta planta. Deve-se ressaltar, entretanto, que a plasticidade fenotípica da espécie acarreta uma diferença, principalmente quantitativa, quanto aos compostos presentes na planta, além do que podem se somar outros componentes durante o preparo, aumentando a variação de sua composição (DELLACASSA & BANDONI, 2001).

O estudo da composição química das folhas e do extrato aquoso de *I. paraguariensis* mostrou a presença de polifenóis, metilxantinas (majoritariamente a cafeína), saponinas, três vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina e niacina), as vitaminas A, C e E, ácido clorogênico e seus derivados, ácido ursólico, flavonoides e antocianinas (BRACESCO *et al.*, 2011; DELLACASSA & BANDONI, 2001; DUARTE, 2010; VALDUGA *et al.*, 1997). Também se mostram presentes os minerais cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, selênio e zinco (DELLACASSA & BANDONI, 2001; DUARTE, 2010; DUCAT & QUINÁIA, 2009).

A importância medicinal dos polifenóis é atribuída ao seu alto poder antioxidante (PULIDO *et al.*, 2000), isto porque os compostos oxidantes, mesmo que gerados durante o metabolismo normal do organismo, causam lesões ao DNA, às proteínas e aos lipídeos. Os danos causados pelo excesso de compostos oxidantes nos organismos, ou seja, o estresse oxidativo, são doenças como diabetes, fibrose

cística, catarata e infecções (AMES *et al.*, 1993; SOUZA, 2009). A erva mate apresenta como principal composto polifenólico o ácido clorogênico (HECK & DE MEJIA, 2007) e o extrato de suas folhas revelou-se um inibidor de oxidantes, tendo sido capaz de reverter danos renais causados por espécies reativas de oxigênio em ratos diabéticos (DUARTE, 2010). Em comparação ao chá verde [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze], o chá mate exibe uma concentração levemente mais alta deste tipo de polifenóis, correlacionada com uma maior capacidade antioxidante em relação ao chá verde (HECK & DE MEJIA, 2007)

Os alcaloides presentes na erva-mate são a cafeína (presente em altas concentrações), a teobromina e a teofilina, três metilxantinas, sendo que a última se encontra em concentrações muito baixas, ocasionalmente indetectáveis (CANTO, 2007; DELLACASSA & BANDONI, 2001; HECK & DE MEJIA, 2007). A concentração de cafeína nas folhas de *I. paraguariensis*, em comparação com outras espécies do gênero, mostra-se significativamente maior, apesar de haver variações dependendo do período do ano em que se realiza a colheita (SCHUBERT *et al.*, 2006), sendo que *I. paraguariensis paraguariensis* e *I. paraguariensis vestita* apresentam maior concentração de cafeína e teobromina no verão em comparação à primavera. Além do mais, os teores de cafeína e teobromina variam com relação às etapas de processamento da erva-mate e à progênie das plantas (ESMELINDRO *et al.*, 2002; SCHERER *et al.*, 2002). A grande concentração de cafeína na erva-mate é responsável pelo efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, razão principal de seu consumo, e pode contribuir com a atividade lipolítica (DELLACASSA & BANDONI, 2001; HECK & DE MEJIA, 2007).

Em folhas de *I. paraguariensis*, as saponinas são derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico, sendo elas as matessaponinas 1-5, guaiacina B, nudicaucina C, J1 a e b, J2 a e b e J3 a e b (CANTO, 2007). A fração de saponinas enriquecida dos frutos verdes de erva mate apresenta atividade antimicrobiana sobre *Trichomonas vaginalis* (TRETER *et al.*, 2010). Ainda, o extrato aquoso da erva-mate, por seu conteúdo de saponinas, tem ação hipocolesterolêmica, isto porque estes compostos formam micelas com o colesterol, impedindo sua absorção (HECK & DE MEJIA, 2007).

## PROBLEMAS NA PRODUÇÃO DA ERVA-MATE (*I. PARAGUARIENSIS*)

Apesar de sua importância socioeconômica e cultural na região sul da América do Sul, tradicionalmente a erva-mate sempre teve um valor secundário para a indústria alimentícia, em comparação a cultivos como milho, trigo ou arroz, gerando pouco incentivo para programas de melhoramento genético da espécie, sendo estes escassos no Brasil (STURION & DE RESENDE, 1997). Como estes autores ressaltaram, é urgente que estes programas iniciem com força, visto que grandes áreas de ervais nativos foram derrubadas e o elevado extrativismo que acompanha a produção desta cultura no Brasil tem causado a fragmentação de populações da espécie.

Para que a implantação de novos ervais ou de sistemas mistos induza um aumento substancial da produção, é necessária a superação de adaptações biológicas da espécie, como a germinação desuniforme e lenta, e de características do solo. Isso porque a espécie geralmente ocorre em solos com baixo teor de nutrientes trocáveis e alto teor de alumínio disponível (DE OLIVEIRA & ROTTA, 1983). Além da baixa fertilidade dos solos, há uma intensificação do problema pelas atividades inerentes ao cultivo, pois durante a colheita do mate há uma grande exportação de nutrientes, como nitrogênio, potássio, manganês e ferro (GAIAD, 2003; WOLF, 2005).

O nitrogênio, o quarto elemento mais abundante na fitomassa (LARCHER, 2000), é essencial para as plantas, pois sua deficiência impede que a planta complete seu ciclo vital, é insubstituível e participa diretamente do metabolismo vegetal (DECHEN *et al.*, 2006). A presença do nitrogênio em moléculas básicas dos organismos, como ácidos nucleicos e aminoácidos, fornece a ele um papel crucial na fisiologia, por esta razão, é um dos elementos mais requisitados por vegetais, sendo o macronutriente absorvido em maior quantidade a partir do solo. Este mineral e a luz, segundo a hipótese da co-limitação do crescimento apresentada por SOUSSANA *et al.* (1998), desenvolvem nas plantas uma coordenação entre a absorção do primeiro e a fotossíntese. Essa relação entre a fotossíntese e o nitrogênio torna, segundo

LARCHER (2000), o crescimento da planta limitado principalmente pela oferta de nitrogênio.

Corroborando esta hipótese, no experimento de GAIAD *et al.* (2006), plântulas de erva mate que receberam suprimento de nitrogênio, em forma de amônio, nitrato ou ureia, apresentaram maior fotossíntese líquida e maior produção de folhas novas em comparação às plantas que não receberam suplementos de nitrogênio. Diversos autores já ressaltaram os benefícios trazidos pela adubação nitrogenada ao cultivo da erva-mate (GAIAD *et al.*, 2006; LOURENÇO *et al.*, 1997; PINTRO *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2008), sendo realçado o aumento da biomassa foliar, o produto comercial da erva-mate. Esta adubação se faz necessária principalmente para repor os níveis de nitrogênio do solo, dada a grande exportação deste nutriente pela colheita da erva-mate, como supracitado. Estes estudos facilitam a produção deste cultivo e a compreensão dos efeitos do extrativismo em ervais nativos, entretanto também são preocupantes dados os problemas causados pelos fertilizantes químicos nitrogenados.

Apesar do nitrogênio representar 78% dos gases da atmosfera, a forma química na qual se encontra neste reservatório é inerte, não podendo ser usado por nenhum eucarioto. De acordo com SOUZA & FERNANDES (2006), o dinitrogênio ( $N_2$ ) possui uma reatividade extremamente baixa, e não existe agente oxidante algum em condições ambientais que seja capaz de oxidá-lo, tampouco algum agente redutor capaz de reduzi-lo em meio aquoso. As descargas elétricas produzem na atmosfera óxidos de nitrogênio, os quais são então arrastados ao solo e ficam disponíveis para as plantas, porém esta produção não sustenta a necessidade das plantas. Como o modelo de agricultura convencional depende de um aporte periódico alto de nitrogênio para que se mantenha, o nitrogênio é reduzido pelo processo de Haber-Bosch (MARIN *et al.*, 1999). Neste, ocorre a fusão de nitrogênio atmosférico com  $H_2$ , gerando amônia, com alto gasto energético, visto que exige uma temperatura aproximada de  $400^\circ C$  e pressões entre 150 e 300 atm (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Esta necessidade periódica de nitrogênio impõe um obstáculo às mudanças necessárias para a manutenção da humanidade e da biodiversidade na



Terra, visto que acarreta a um alto gasto energético e também efeitos prejudiciais como contaminação da água e do solo com nitrogênio. Apesar de que o nitrogênio no ambiente pode se apresentar em diversas formas químicas, uma das que permanece por mais tempo no solo é o nitrato, que, ao escoar para fora do alcance das plantas, afeta negativamente o solo, a atmosfera e os recursos hídricos (ROUSE *et al.*, 1999). O uso destes fertilizantes em algumas culturas excede o necessário na agricultura convencional, o que, nos Estados Unidos, causa a perda de 473 a 624 milhões de dólares por ano aos fazendeiros (TRACHTENBERG & OGG, 1994). Essa prática tem parte da responsabilidade pela eutrofização de corpos de água, que pode ocasionar a morte por hipóxia de organismos aquáticos pelo *bloom* de algas (KRONVANG *et al.*, 2008). Além disso, ROUSE *et al.* (1999) relataram os problemas trazidos pela poluição da água com nitrato em comunidades de anfíbios, cujos imaturos sofrem com a toxicidade desta substância, enquanto alguns insetos e peixes adultos são mais resistentes. Isto pode levar a um aumento na predação de ovos e girinos por peixes, além de poder causar uma mudança no comportamento dos anfíbios pela maior razão entre insetos e anfíbios.

Estas questões associadas aos fertilizantes nitrogenados são obstáculos a serem estudados e superados na busca do aumento da produtividade da erva-mate. O custo da adubação nitrogenada, de acordo com DÖBEREINER (1990), representa geralmente 70% do total dos fertilizantes. Assim sendo, é necessária a busca de alternativas que viabilizem o aumento da produção por pequenos produtores e diminuam a poluição causada pelos fertilizantes.

#### MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

A produção química de amônia obviamente não é a única fonte de nitrogênio para as plantas. De fato, apesar de uma pequena fração do nitrogênio atmosférico ser disponibilizada aos organismos por ação de descargas elétricas, a maior fonte de nitrogênio dos organismos eucariotos é a fixação biológica de nitrogênio, unicamente realizada por organismos procariotos (MYLONA *et al.*, 1995; REIS *et al.*, 2006). Este processo tem um alto custo energético e pode ser resumido pela equação 1, uma reação catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase.



Devido ao alto custo dos fertilizantes nitrogenados no Brasil, os melhoristas acabaram selecionando as variedades de determinadas plantas cultivadas que mais se beneficiavam da interação com procariotos diazotróficos, cultivando leguminosas e gramíneas com aplicações de nitrogênio muito baixas em comparação com o real requerimento das plantas, tornando a agricultura no país economicamente viável (DÖBEREINER, 1997). Desde o início do século passado, as plantas da família Fabaceae, as leguminosas, têm sido amplamente estudadas por sua interação com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (REIS *et al.*, 2006), em que a bactéria penetra na planta através dos pelos radiculares e é guiada até a região cortical. Ao chegar ali, ela é envolvida, dentro do citoplasma da célula vegetal, por uma membrana peribacterioide e sintetiza o complexo enzimático da nitrogenase. Enquanto isso, as células corticais da planta se dividem formando um nódulo no qual a nitrogenase é protegida do efeito inativador do oxigênio pela presença da proteína leghemoglobina (FAGAN *et al.*, 2007; MYLONA *et al.*, 1995; WALSH, 1995).

Além da interação rizóbios-leguminosas, REIS *et al.* (2006) também citaram existência da interação entre *Frankia*, um gênero de procariotos actinomicetos, com nove famílias de plantas, em que a fixação de nitrogênio também ocorre no interior de nódulos radiculares, e de *Nostoc*, uma cianobactéria, com briófitas, pteridófitas, Cycadophyta e com o gênero *Gunnera*. Segundo (DÖBEREINER, 1997), até a década de 1980 se acreditava que as gramíneas plantadas no Brasil adquiriam parte de seu nitrogênio a partir de rizobactérias associadas a elas, implicando o fornecimento, por rizobactérias, de 20 a 40% do nitrogênio requerido por determinadas culturas. No entanto, foi descoberta a interação de bactérias endofíticas diazotróficas com estas plantas. Entre as espécies encontradas em associação com gramíneas estão as do gênero *Azospirillum*, endofíticas facultativas já encontradas em diversas culturas de ambientes tropicais e temperados (PEDRAZA *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2011) e endofíticas obrigatórias como *Gluconacetobacter* spp. e *Herbaspirillum* spp. (BALDANI & BALDANI, 2005; MARIN *et al.*, 1999; MEHNAZ & LAZAROVITS, 2006; REIS *et al.*, 2011).

Em todas essas bactérias, o complexo enzimático nitrogenase é essencialmente o mesmo, composto por duas metaloproteínas: a ferro-proteína (Fe-proteína) e a molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína) (FAGAN *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 1998). De acordo com TEIXEIRA *et al.* (1998), durante a redução do nitrogênio atmosférico, ocorrem três passos de transferência de elétrons: 1) a Fe-proteína é reduzida por carreadores de elétrons, frequentemente a ferredoxina reduzida (FAGAN *et al.*, 2007); 2) a Fe-proteína transfere elétrons para a MoFe-proteína, gastando 2 Mg-ATPs para cada elétron transferido; 3) três elétrons são transferidos a cada nitrogênio ligado à MoFe-proteína. Esta reação tem alto custo energético, visto que são gastos 16 Mg-ATPs para a formação de duas moléculas de amônia (equação 1). Por este fato, bactérias diazotróficas são mais comuns em solos pobres em nitrogênio ou em cultivos com baixas aplicações de nitrogênio, visto que há uma preferência pela utilização do nitrogênio já disponível no solo (DOBEREINER, 1984).

Além da fixação biológica de nitrogênio, as bactérias diazotróficas, e outros microrganismos, beneficiam as plantas por outros mecanismos, ainda não completamente desvendados. Por exemplo, sabe-se que muitos microrganismos secretam hormônios vegetais (principalmente auxinas), solubilizam nutrientes comumente insolúveis no solo, são antagonistas contra patógenos vegetais e podem induzir a resistência local ou sistêmica das plantas contra patógenos (DA SILVA ARAÚJO *et al.*, 2013; ISLAM *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2004; LUCY *et al.*, 2004; TORTORA *et al.*, 2011). Entretanto, a intensidade da promoção de crescimento vegetal induzida por microrganismos varia com relação à linhagem de microrganismo, ao genótipo da planta e às condições ambientais (DA SILVA ARAÚJO *et al.*, 2013; MEHNAZ & LAZAROVITS, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003; RAMOS-SOLANO *et al.*, 2010).

A auxina regula diversos aspectos do ciclo celular e de vida da planta, desde o alongamento celular até a senescência de órgãos, de modo que microrganismos que produzem este hormônio agem diretamente no desenvolvimento vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2009). BUENSANTEAI *et al.* (2013) mostraram que a inoculação de *Bacillus* sp. CaSUT007 (que secretou alta concentração de ácido indolacético [AIA], 31 µg/mL), das proteínas extracelulares desta bactéria ou dos extratos

indólicos produzidos por ela, incrementou o comprimento radicular e aéreo de estacas de mandioca (*Manihot esculenta* Crants) em até 30%. Em *Gluconacetobacter diazotrophicus*, LEE *et al.* (2004) encontraram que mutantes no gene da biogênese de citocromo C apresentavam produção de AIA reduzida e, apesar de colonizarem cana de açúcar com eficiência similar à estirpe selvagem, não promoviam o crescimento das plantas, indicando um papel importante da produção de AIA na indução do crescimento. Também fungos do gênero *Trichoderma*, com diversas espécies promotoras de crescimento vegetal, revelaram-se produtores de auxinas. CONTRERAS-CORNEJO *et al.* (2009) relataram que *T. virens* e *T. harzianum* promoveram o crescimento de raízes laterais de *Arabidopsis*. *T. virens* também aumentou a respostas das plântulas inoculadas a auxinas, não obstante plântulas com mutações em genes que codificam transportadores deste hormônio tinham resposta reduzida ao fungo. Este fungo também se mostrou produtor das seguintes auxinas: AIA, indol-3-acetaldeído e indol-3-etanol.

Mesmo assim, o efeito de auxinas nas plantas é dependente da concentração (TAIZ & ZEIGER, 2009). Ao estudar culturas de *Azospirillum*, DOBBELAERE *et al.* (1999) relataram a presença de giberelinas, citoquininas e auxinas no sobrenadante, sendo a produção de AIA a maior dentre as três. O efeito do aumento da concentração do inóculo de *Azospirillum brasilense* Sp6 na morfologia radicular foi similar ao aumento da concentração de AIA, sendo ele a diminuição do alongamento da raiz e o aumento na densidade dos pelos radiculares. KEYEO *et al.* (2011) descreveram um efeito similar em plântulas de arroz inoculadas com *Azospirillum brasilense* Sp7 e *Herbaspirillum seropedicae* Z78, que apresentaram menor peso seco total e alongamento das raízes, além de apresentarem menor conteúdo proteico e de clorofila nas folhas. Estas estirpes apresentaram altas taxas de produção de AIA em comparação com *Gluconacetobacter* sp. L15 e *Enterobacter* sp. L2. Estas últimas, produzindo AIA a taxas baixas, induziram o crescimento das plantas.

A solubilização de nutrientes já foi descoberta em muitos microrganismos, como em *G. diazotrophicus*. SARAVANAN *et al.* (2007) relataram a solubilização de zinco por esta bactéria a partir dos compostos insolúveis ZnO, ZnCO<sub>3</sub> e Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. O filtrado da cultura desta bactéria também causou a mortalidade do

nematódeo fitopatígeno *Meloidogyne incognita*, sendo esta mortalidade ainda maior quando a bactéria foi crescida em meio com ZnO. Além disso, CRESPO *et al.* (2011) descreveram a solubilização de fosfato mineral pela bactéria, quando cultivada com glicose, arabinose, galactose ou xilose como fonte de carbono (carboidratos que são substrato da enzima glicose desidrogenase pirroquinolina quinona [PQQ-GDH]), associada com o descenso do pH da cultura. Também, o fungo *T. harzianum* Rifai 1295-22 foi capaz de solubilizar fosfato e zinco, além de manganês e ferro (ALTOMARE *et al.*, 1999). De acordo com KÜÇÜK *et al.* (2008), a solubilização de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e de zinco metálico por *T. harzianum* T1 não está associada a alguma atividade proteica, entretanto houve diferença de solubilização de CuO e de MnO<sub>2</sub> entre o do filtrado da cultura do fungo autoclavado e tratado com proteinase K, e a solubilização de MnO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e de Zn ocorreu em pH levemente alcalino ou levemente ácido.

A existência de antagonismo contra fitopatógenos foi relatada em diversos microrganismos com as características benéficas às plantas descritas anteriormente, além disso, muitos deles têm também a capacidade de induzir a resistência das plantas contra outros patógenos (BALLY & ELMERICH, 2007), podendo assim ser usados junto com ou no lugar dos pesticidas químicos. Dentre os vários casos relatados, BOUILLANT *et al.* (1997) encontraram que *A. brasilense* L4, uma estirpe isolada a partir de plantações de sorgo não afetadas pela planta parasita *Striga* sp., além de promover o aumento do peso radicular e do comprimento aéreo de sorgo, inibiu completamente a germinação de *Striga* sp. assim como a estirpe *A. brasilense* L2, apesar de que esta não promoveu o crescimento de sorgo. Esta bactéria também se mostrou antagônica contra *Colletotrichum acutatum* pela produção de sideróforos (dentre eles, o ácido salicílico, que também age como regulador de resistência local e sistêmica adquirida), sequestradores de ferro, tanto *in vitro* quanto em plantas de morango de dois cultivares (TORTORA *et al.*, 2011). Entretanto, a produção de sideróforos e, por consequência, o antagonismo contra o fungo diminuíram significativamente com a adição de ferro ao meio, já que a bactéria só os sintetiza quando este elemento é limitante no ambiente.

O antagonismo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra diversos fitopatógenos já foi registrado por diversos pesquisadores. (MUTHUKUMARASAMY

*et al.*, 2000) encontraram, entre três isolados de *G. diazotrophicus* (anteriormente *Acetobacter diazotrophicus*), entre 15, com efeito inibitório contra *C. falcatum* Went, patógeno de cana de açúcar. O antagonismo se dá possivelmente por difusão de substâncias antifúngicas, depleção de nutrientes e mudança de pH. Enquanto isso, PIÑÓN *et al.* (2002) relataram a produção em meio líquido de um fator, provavelmente proteico, capaz de impedir o crescimento de *Xanthomonas albilineans* por meio da destruição da camada mais interna da parede celular desta bactéria, levando à perda do conteúdo citoplasmático.

### ***Azospirillum brasilense***

As bactérias *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* foram as duas primeiras espécies descritas deste gênero, capazes de fixar nitrogênio em vida livre (TARRANT *et al.*, 1978). Desde então, outras espécies foram descritas no gênero e *A. brasilense* foi se tornando uma das espécies de bactérias diazotróficas mais estudadas. Esta espécie é descrita como diazotrófica endofítica facultativa, sendo capaz de sobreviver tanto em vida livre quanto no interior de plantas (CASSÁN *et al.*, 2015).

A inoculação dessa bactéria em milho e trigo (HUNGRIA, 2011), arroz (DIDONET *et al.*, 2003) e morango (PEDRAZA *et al.*, 2010) mostram a capacidade de *A. brasilense* promover o crescimento de plantas. Mesmo que a quantidade de estudos envolvendo essa bactéria seja alta, os mecanismos responsáveis por essa promoção são ainda discutidos. Isso porque a bactéria é fixadora de nitrogênio, o que induz muitos autores a associar a interação benéfica a esta habilidade bacteriana. Entretanto, a FBN parece ter importância reduzida em certas interações planta-bactéria em comparação a outros mecanismos deste procarionto (CASSÁN *et al.*, 2015). Além de ser fixadora de nitrogênio, *A. brasilense* é capaz de sintetizar e secretar uma série de hormônios vegetais, como auxinas e citoquininas (MAHESHWARI, 2011), de solubilizar fosfato (BASHAN & DE-BASHAN, 2010) e apresenta antagonismo contra alguns fitopatógenos (TORTORA *et al.*, 2011).

O efeito da inoculação com *A. brasilense*, de acordo com MARCHIORO (2005), é a alteração na densidade e no comprimento dos pelos radiculares, resultando em maior superfície radicular e na melhoria da exploração dos nutrientes e da água do solo. BASHAN & DE-BASHAN (2010) relatam que existe a possibilidade de a redução do nitrato, e não a fixação de nitrogênio, induzir o crescimento das plantas por intermédio do nitrogênio. Mesmo assim, segundo HUNGRIA (2011), nos ensaios conduzidos no Brasil, o aumento da produtividade de cultivos pela inoculação com *A. brasilense* não se relaciona somente com o nitrogênio, mas também com o fósforo e o potássio. Por fim, os trabalhos sequenciais de PEDRAZA *et al.* (2010); TORTORA *et al.* (2012); TORTORA *et al.* (2011) relataram a promoção do crescimento de plantas de morango por essa bactéria, a indução de resistência contra *Colletotrichum acutatum* e o potencial antagônico dos sideróforos de *A. brasilense* sobre este fungo, indicando diversos mecanismos de promoção de crescimento.

#### ***Gluconacetobacter diazotrophicus***

Descrita por CAVALCANTE & DOBEREINER (1988) como *Acetobacter diazotrophicus*, essa bactéria foi conhecida como endofítica obrigatória de cana de açúcar, não ocorrendo na rizosfera dessa planta. Posteriormente ela foi mudada para o gênero *Gluconacetobacter* por análise do rRNA 16s (ESKIN *et al.*, 2014). Após seu isolamento na cana de açúcar, essa bactéria já foi encontrada em várias outras plantas, como arroz, batata doce, café, abacaxi e banana (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2002).

A capacidade de fixação de nitrogênio por *G. diazotrophicus* é notável, sendo responsável por 20 a 40% do nitrogênio incorporado por *Brachiaria* spp (DÖBEREINER, 1990). De acordo com JAMES *et al.* (2001), o caráter endofítico desta bactéria a torna uma fixadora de nitrogênio muito mais eficiente que outras bactérias diazotróficas, visto que ela é capaz de receber diretamente os fotossintatos da planta e habita um ambiente com baixa concentração de O<sub>2</sub>, impedindo a inibição da nitrogenase. Não obstante, a promoção do crescimento por *G. diazotrophicus* vai muito além da FBN. Ela é capaz de solubilizar zinco (SARAVANAN *et al.*, 2007) e

fosfato (CRESPO *et al.*, 2011), produzir auxinas e giberelinas (BASTIÁN *et al.*, 1998) e apresenta potencial antagônico contra fitopatógenos como *Xanthomonas albilineans* (BLANCO *et al.*, 2005), *Meloidogyne incognita* (SARAVANAN *et al.*, 2007) e *Colletotrichum falcatum* (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2000).

### ***Trichoderma harzianum***

Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por serem micoparasíticos e micotróficos, ou seja, parasitam e predam outros fungos. Além disso, são organismos que se relacionam benéficamente com as raízes de plantas, são muito bem adaptados ao ambiente rizosférico e têm alto potencial competitivo com patógenos de plantas (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010). Esse gênero é constituído por fungos capazes de alterar o pH externo, mantendo sempre o ambiente adjacente em condição ótima para seu crescimento (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Eles ainda são capazes de sintetizar antibióticos e micotoxinas, além de dezenas de metabólitos com atividade antibiótica (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010).

Por essas características, *T. harzianum* é muito citado na literatura por seu potencial antagônico e de biocontrole contra fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* (SIVAN & CHET, 1989), *Colletotrichum musae* (BONETT *et al.*, 2014) e *Cylindrocladium scoparium* (CARVALHO FILHO *et al.*, 2008). *Trichoderma* também é capaz de promover o crescimento de plantas por mecanismos diretos, como a indução da síntese de auxinas (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009) e a solubilização de nutrientes (KÜÇÜK *et al.*, 2008). Por esse grande potencial no biocontrole de patógenos e na promoção direta do crescimento vegetal, já existe no mercado bioformulações à base de *Trichoderma* spp. (MACHADO *et al.*, 2012).



## Justificativa

Considerando-se a importância da erva-mate para os países do sul da América do Sul e o aumento de sua demanda, alguns processos relacionados ao seu cultivo precisam ser melhorados, com o intuito de reestabelecer ervais em áreas adequadas. Dentre estes processos se encontram a formação de mudas (Pintro *et al.*, 1998). Entretanto, tradicionalmente a erva-mate tem uma importância secundária em relação a cultivos como o arroz ou o milho. Por isso, existem poucos relatos na literatura sobre seu desenvolvimento, principalmente nos estágios iniciais pós germinação.

Nos últimos anos, estudos provenientes da ecologia, agronomia e biologia do desenvolvimento mostram uma clara necessidade de adoção de práticas agrícolas menos agressivas, como o uso de microrganismos no biocontrole de patógenos e como biofertilizantes. Assim, o estudo da interação de *I. paraguariensis* com microrganismos de amplo uso como biofertilizantes e agentes de biocontrole de patógenos mostra-se benéfico para esse cultivo e necessário para a melhora da saúde ambiental e humana.

## Materiais e Métodos

### MATERIAL BIOLÓGICO

Os inóculos das bactérias foram preparados de acordo com o protocolo descrito por DÖBEREINER (1997). Foram preparados inóculos das bactérias *Azospirillum brasilense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* a partir de soluções estoque contendo 800 µL de bactéria concentrada e 200 µL de glicerol 80% armazenadas a -80°C. A partir da solução estoque, a bactéria foi estriada em meio DYGS sólido e incubada a 28°C por 72 horas. Após isso, colônias isoladas foram transferidas a tubos falcon com 5 mL de meio DYGS líquido, constituindo o pré-inoculo, mantidos em agitação por 48 horas a 28°C objetivando a saturação do crescimento bacteriano. Posteriormente, o pré-inoculo foi diluído em DYGS líquido para a obtenção de absorbância 1 (DO<sub>600</sub>), equivalente a uma concentração de 10<sup>7</sup> UFC/mL. O inóculo foi preparado com 1% de pré-inoculo. Também foi preparado o inóculo fúngico de *Trichoderma harzianum* a partir da formulação comercial Trichodermil®, diluindo 2 g da formulação em 1 L de água, com concentração final de 2x10<sup>7</sup> Conidia/mL. Os microrganismos foram escolhidos por serem amplamente descritos na literatura como benéfico para plantas e por apresentarem mecanismos de interação e promoção de crescimento de plantas com diferenças importantes entre si.

Tabela 1: Composição do meio DYGS apto para bactérias diazotróficas

Composto químico	Quantidade
Glicose	2,0g
Ácido málico	2,0g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2,0g
K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
Água destilada	1000 ml

Plantas, germinadas a partir do mesmo lote de sementes do Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Misiones, Argentina, de um mês pós-germinação, cedidas gentilmente pelo viveiro Los Pinos (Jardin América, Misiones – Argentina), foram retiradas do solo (Figura 3) e suas raízes ficaram expostas por 5 minutos para indução de um leve estresse hídrico, facilitando a entrada dos microrganismos. Elas foram distribuídas aleatoriamente a quatro tratamentos, cinquenta plantas por tratamento, sendo eles a inoculação com *A. brasilense*, *G. diazotrophicus* e *T. harzianum* e o tratamento controle. As raízes das plantas foram imersas nos inóculos dos microrganismos ou em água, no caso do tratamento controle, por 15 minutos (Figura 4). Após a inoculação, 1/3 da raiz principal de cada planta foi retirado, evitando sua quebra, e as plantas foram colocadas em tubetes com terra e casca de *Pinus*. A terra e a casca de *Pinus* foram misturadas, hidratadas e então distribuídas entre as matrizes de tubetes, de modo que os tratamentos recebessem substrato de igual procedência e tratado de igual forma. As bandejas de tubetes foram alocadas de modo aleatório (Figura 5) e as plantas foram mantidas sob os cuidados do viveiro Los Pinos por cinco meses. Foi pedido ao viverista o tratamento igualitário das plantas dos tratamentos entre si e entre os demais espécimes de *I. paraguariensis* do viveiro, entretanto foi solicitado que as plantas do experimento não fossem adubadas de qualquer maneira. As plantas ficaram sob sombrite 50% e expostas ao ambiente.

Figura 3. Plantas de um mês pós-germinação em sementeira.



Figura 4. Sistema de inoculação de plantas.



Figura 5. Distribuição de plântulas no viveiro (quatro meses pós-inoculação).



#### ANÁLISE DE CRESCIMENTO

Após cinco meses, período escolhido pela condição das plantas e pela dificuldade de visitar o local do experimento, as plantas foram analisadas aferindo-se massa fresca e comprimento das partes aérea e radicular e da planta inteira. As amostras foram infectadas pela ampola da erva-mate (*Gyropsylla spegazzianiana*, Psyllidae; Figura 6), plantas com ampolas desenvolvidas nas folhas e 29 plantas que morreram pela infestação. Assim, no momento da aferição todos os tratamentos possuíam 43 plantas, exceto o tratamento controle, que possuía 42 plantas. O número de folhas infectadas por planta por tratamento não foi contabilizado. Também se analisou a razão entre o comprimento aéreo e radicular, assim como entre a massa fresca aérea e radicular. Foi verificada a homogeneidade das variâncias de cada variável pelo teste Levene<sup>2</sup> e posteriormente os dados foram analisados pelos testes paramétricos ANOVA e Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o software OriginPro 8.6 (2012). Os dados brutos coletados se encontram nos anexos nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Figura 6. Plântula de erva-mate com folha infectada com ampola da erva-mate (*Gyropsylla spegazzianiana*). Círculo vermelho indicando ampola com ovos do inseto.



## Resultados e Discussão

Neste experimento, 50 plântulas de *Ilex paraguariensis* (por tratamento) foram inoculadas com três microrganismos benéficos, *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Trichoderma harzianum*. As Figuras 7, 8, 9 e 10 mostram o box plot do comprimento e da massa fresca total, radicular e aérea e da razão entre comprimento e massa fresca aérea e radicular, respectivamente. A Figura 11 mostra as médias da razão entre comprimento aéreo e radicular e massa fresca aérea e radicular, respectivamente. Quanto ao comprimento, não houve diferença entre os tratamentos entre proporção aérea e radicular das plantas, mas em relação à massa fresca, os tratamentos com a bactéria *G. diazotrophicus* e o fungo *T. harzianum* mostraram proporção aérea significativamente menor que a proporção radicular em relação ao tratamento controle. O tratamento com a bactéria *A. brasilense* não diferiu do tratamento com os demais microrganismos ou do tratamento controle. As Figuras 1 e 2 dos anexos mostram a comparação do comprimento e da massa fresca, respectivamente, total, radicular e aérea dos tratamentos.

Figura 7. Box plot do comprimento e da massa fresca total dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle). Quadrados indicam a média e "x" indicam posição do 1% e do 99% dos espécimes amostrados.

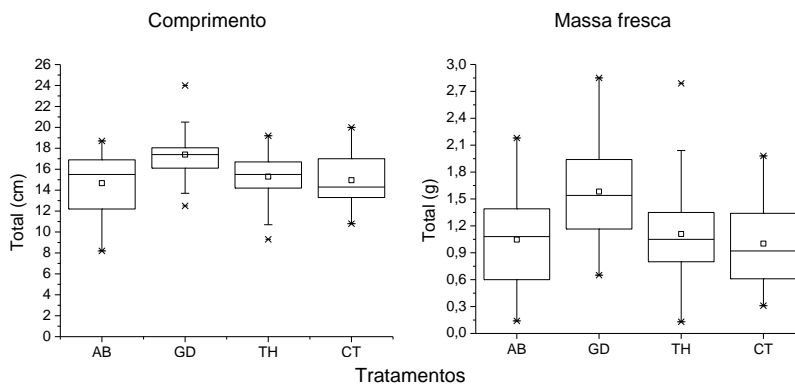


Figura 8. Box plot do comprimento e da massa fresca radicular dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle). Quadrados indicam a média e "x" indicam posição do 1% e do 99% dos espécimes amostrados.

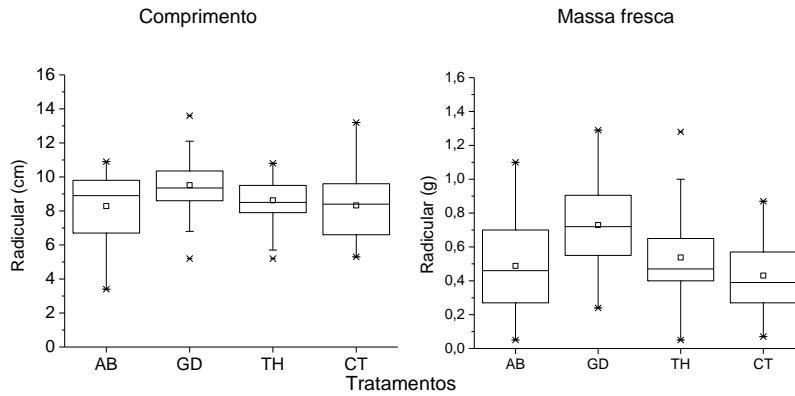


Figura 9. Box plot do comprimento e da massa fresca aérea dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle). Quadrados indicam a média e "x" indicam posição do 1% e do 99% dos espécimes amostrados.

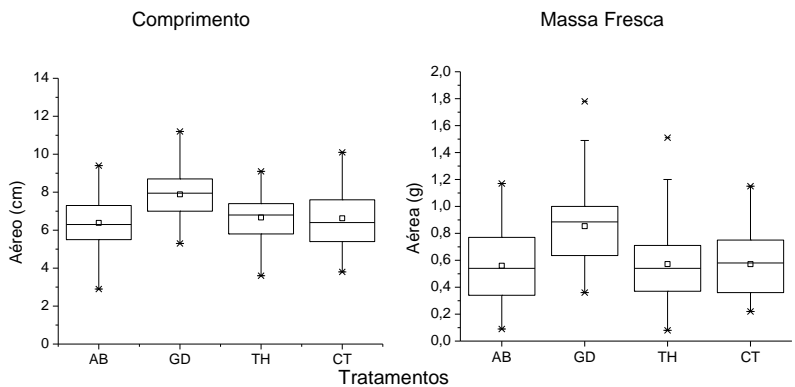


Figura 10. Box plot da razão entre comprimento aéreo e comprimento radicular e razão entre massa fresca aérea e massa fresca radicular dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*)



e CT (inoculação com água, controle). Quadrados indicam a média e "x" indicam posição do 1% e do 99% dos espécimes amostrados.

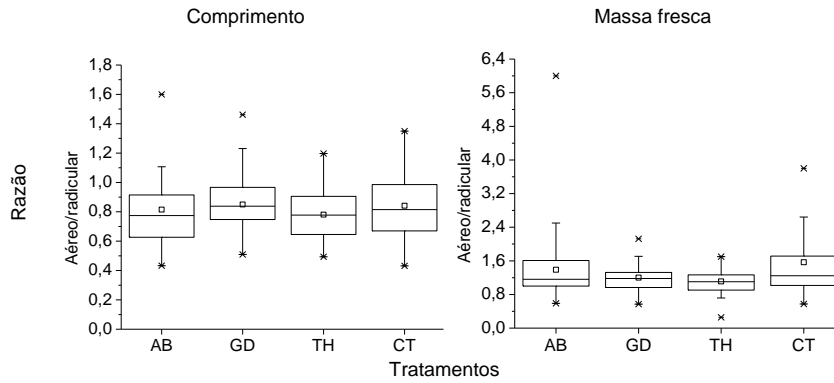
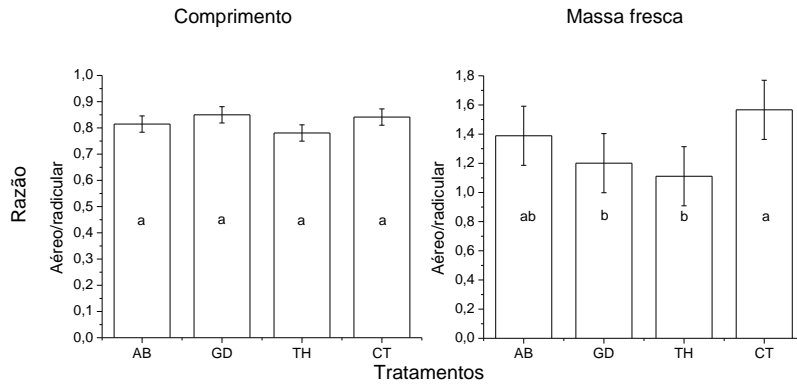


Figura 11. Média da razão entre comprimento aéreo e comprimento radicular e razão entre massa fresca aérea e massa fresca radicular dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre as médias. ANOVA para massa fresca:  $F=4,14$ ,  $p=0,007$ .



É notável que, apesar da extensa literatura relatando diversas características promotoras de crescimento presentes nos três microrganismos aqui inoculados na erva-mate, somente a bactéria *G. diazotrophicus*, conhecida por interagir com a cana de açúcar e ocorrer obrigatoriamente no interior desta planta,

promoveu o crescimento das plantas de *I. paraguariensis* (Figura 12). Como mostrado nas Figuras 13 e 14, as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* apresentaram maior comprimento e massa fresca que as plantas controle e dos demais tratamentos, com exceção do comprimento radicular, em que o tratamento GD não diferiu das plantas inoculadas com o fungo *T. harzianum* (tratamento TH). A promoção do crescimento das plântulas é mais notável no parâmetro massa fresca radicular, em que as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* apresentaram raízes em média 69% mais pesadas que aquelas inoculadas com água ( $[\text{média GD}/\text{média CT}] * 100$ ).

Figura 12. Plântulas de *Ilex paraguariensis* cinco meses após inoculação com água (controle, A e B) *Azospirillum brasilense* (C e D), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (E e F), *Trichoderma harzianum* (G e H).



Figura 13. Média do comprimento total, radicular e aéreo de plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* (AB), com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GD), *Trichoderma harzianum* (TH) e das plantas controle não inoculadas (CT). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. (Comprimento total:  $F=11,62$ ,  $p<0,001$ ; Comprimento radicular:  $F=5,15$ ,  $p=0,002$ ; Comprimento aéreo:  $F=8,39$ ,  $p<0,001$ ).

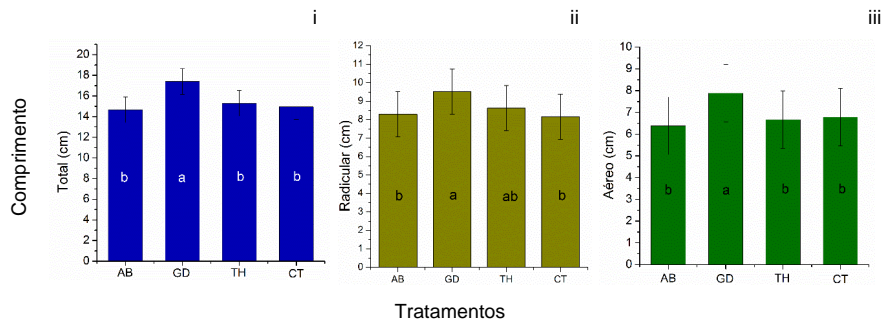
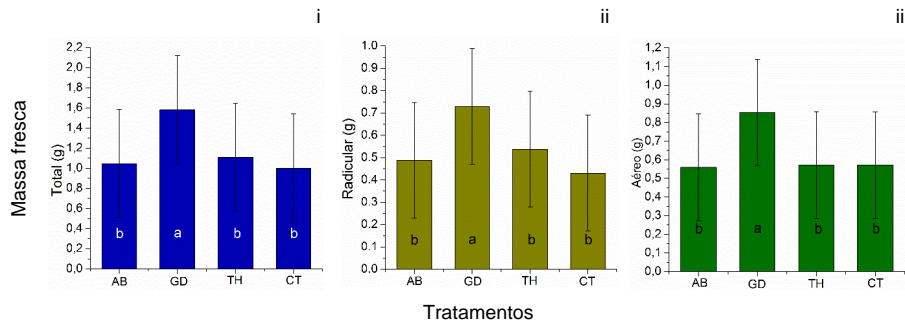


Figura 14. Média da massa fresca total, radicular e aérea de plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* (AB), com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GD), *Trichoderma harzianum* (TH) e das plantas controle não inoculadas (CT). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. (Massa fresca total:  $F=12$ ,  $p<0,001$ ; Massa fresca radicular:  $F=11,6$ ,  $p<0,001$ ; Massa fresca aérea:  $F=10,62$ ,  $p<0,001$ ).



O fato de as plantas de *I. paraguariensis* inoculadas com *A. brasilense* não diferirem do tratamento controle em nenhum dos parâmetros analisados pode ser devido a diversos fatores. Primeiramente, como colocado por PEDRAZA *et al.* (2010), algumas inoculações podem não resultar em efeito positivo mensurável, mas as plantas podem apresentar maior resistência contra estresses ambientais, o que não foi verificado neste estudo. Outro fator pode ser a secreção excessiva de AIA pela bactéria. DOBBELAERE *et al.* (1999), estudando o efeito da inoculação de sementes de trigo com *Azospirillum brasilense*, ácido indol-acético (AIA) e triptofano, precursor da biossíntese de AIA, encontraram que a inoculação das plantas com concentrações

crecentes da bactéria tinha efeito semelhante ao da inoculação com altas concentrações do fitormônio, sendo ele a diminuição do comprimento radicular assim como o aumento da quantidade de pelos radiculares, sendo que o fenótipo já podia ser visto com a menor concentração de inóculo bacteriano testada, de  $10^6$  UFC/ml. Esta concentração de inóculo bacteriano é menor do que a utilizada no presente trabalho, de  $10^9$  UFC/ml. Também KEYEO *et al.* (2011) avaliou a promoção do crescimento de plântulas de arroz com diferentes bactérias diazotróficas e fixadoras de nitrogênio, dentre elas *A. brasilense* e *Gluconacetobacter* sp., encontraram que as bactérias que secretavam altas concentrações de AIA, como *A. brasilense*, não induziam o crescimento das plantas. Por fim, possível que os exsudados das raízes de *I. paraguariensis* não tenham suficiente fonte de carbono para atrair a bactéria ao rizoplaneo, seguindo a hipótese levantada por PEDRAZA *et al.* (2010).

Nos parâmetros analisados, como se relatou acima, tampouco se detectou a promoção de crescimento da erva-mate com *T. harzianum*. Esse fungo já foi encontrado na rizosfera de plantas de *I. paraguariensis* em cultivos no Brasil (PIMENTEL *et al.*, 2006), indicando sua competência na colonização deste ambiente. Como coloca MACHADO *et al.* (2012), esse fungo apresenta características importantes para a relação benéfica com plantas, sendo elas o micoparasitismo, a competição, a antibiose, a indução de resistência e a promoção do crescimento. A promoção de crescimento de modo direto se dá pela solubilização de nutrientes (ALTOMARE *et al.*, 1999) e pela indução da síntese de fitormônios nas plantas. A competição e antagonismo contra patógenos da erva-mate (ALMEIDA, 2008; SIVAN & CHET, 1989) e a indução da síntese de fitormônios na plantas (SOFO *et al.*, 2011) são fatores que deveriam facilitar o mutualismo entre as duas espécies. Sua ausência neste estudo pode indicar a seletividade de *I. paraguariensis*, já que este fungo interage com um amplo espectro de espécies (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010).

O mutualismo entre *I. paraguariensis* e *G. diazotrophicus*, expresso em maior comprimento e massa fresca das plantas inoculadas com a bactéria em relação às plantas controle, pode ser resultado de diversas características da bactéria, como a secreção de auxina em baixa concentração (KEYEO *et al.*, 2011), a fixação de nitrogênio (CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988), o potencial para o biocontrole

de patógenos (BANSAL *et al.*, 2005; MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2000; PIÑÓN *et al.*, 2002) e a solubilização de nutrientes (CRESPO *et al.*, 2011; SARAVANAN *et al.*, 2007). Também é possível que o caráter endofítico dessa bactéria (JAMES *et al.*, 2001) facilite a interação, visto que as características benéficas citadas anteriormente podem ser melhor aproveitadas pela planta em comparação a microrganismos rizosféricos.

Durante o estudo, as plantas foram afetadas pela ampola da erva-mate (*Gyropsylla spegazzianiana*), o que causou a morte de 23 plantas. De acordo com Flores e Notta (1988) *apud* GONÇALVES *et al.* (2008), os períodos de maior infestação deste inseto na Argentina são entre março e maio e entre agosto e outubro e o presente experimento realizou-se entre agosto e janeiro, sujeitando os espécimes a uma maior população do inseto, principalmente por se tratar de um viveiro, com plantas de erva-mate concentradas como em um monocultivo, onde as infestações são maiores (GONÇALVES *et al.*, 2008). Infelizmente não foi possível quantificar o número de folhas perdidas por planta por tratamento, entretanto, o número de plantas mortas por tratamento foi igual para as inoculações com microrganismos (sete plantas por tratamento), muito semelhante ao número de plantas mortas no grupo controle (oito plantas). Assim, assume-se que a infestação não tendenciou os resultados. Mesmo assim, seria interessante que o experimento fosse repetido com a exclusão desta variável.

Este resultado levanta a possibilidade de uso da bactéria *G. diazotrophicus* como biofertilizante em cultivos da erva-mate. Além disso, esse estudo realça a necessidade de investigação dos solos onde ocorre a erva-mate em busca de microrganismos com características promotoras de crescimento vegetal que já interajam com esta planta induzindo seu crescimento, como fizeram BERGOTTINI *et al.* (2015) na Argentina. Mesmo assim, ainda é necessário compreender os mecanismos responsáveis pela interação de *I. paraguariensis* com *G. diazotrophicus* e indutores do crescimento dessa planta pela citada bactéria.

## Considerações Finais

1. Não foi verificada a promoção do crescimento das plântulas de *I. paraguariensis* inoculadas com a bactéria *Azospirillum brasilense* ou com o fungo *Trichoderma harzianum*, não havendo diferença entre os tratamentos com estes microrganismos e o tratamento controle em nenhum dos parâmetros morfométricos analisados, sendo eles comprimento e massa fresca radiculares, aéreos e totais.
2. Foi verificado o crescimento diferencial das plantas de *I. paraguariensis* inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* em relação às plantas do tratamento controle, sendo que as primeiras apresentaram maiores comprimento e massa fresca radiculares, aéreos e totais.
3. A indução de crescimento de plântulas de *I. paraguariensis* por *G. diazotrophicus* foi mais evidente nas raízes, que apresentaram uma diferença de massa fresca de 69% em relação às plantas do tratamento controle.
4. Pretende-se futuramente avaliar os efeitos da inoculação de *I. paraguariensis* com a bactéria *G. diazotrophicus* na expressão de genes de enzimas do metabolismo do nitrogênio e do metabolismo de fitormônios, verificando se a promoção do crescimento da planta por esse microrganismo se dá pelo fornecimento de nitrogênio, de fitormônios ou de ambos.

## Referências bibliográficas

ALMEIDA. *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum*. 2008. 89p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília, 2008.

ALDOMARE *et al.* Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2926-2933, 1999.

AMES *et al.* Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.

BALDANI & BALDANI. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. p. 549-579, 2005.

BALLY & ELMERICH. Biocontrol of plant diseases by associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria. In: **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations** Dordrecht: Springer, 2007. p. 171-190.

BANSAL *et al.* Management of *Meloidogyne incognita* in cotton, using strains of the bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Nematology Mediterranean**, v. 33, n. p. 101-105, 2005.

BASHAN & DE-BASHAN. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. In: SPARKS, D. L. **Advances in agronomy** Academic Press, 2010. p. 77-136.

BASTIÁN *et al.* Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. p. 7-11, 1998.

BELINGHERI & PRAT KRICUN. Programa de mejoramiento genético de la yerba mate en el INTA. . In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2, session, 1997, Curitiba. **ANAIS**.Colombo: Embrapa-CNPQ, date. p. 267-278.

BENÍTEZ *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology**, v. 7, n. p. 249-260, 2004.

BERGOTTINI *et al.* Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 6, p. 749-755, 2015.

BERMEJO & LÉON. **Neglected crops: 1492 from different perspectives**. Roma: Food and Agricultural Organization of the United Nation, 1994.

BLANCO *et al.* Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 366-371, 2005.

BOGUSZEWSKI. **Uma história cultural da erva-mate: o alimento e suas representações**. 2007. 130p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

BONDARIK *et al.* A produção da erva-mate e a iniciação industrial do Paraná. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ADMINISTRAÇÃO, 19, session, 2006, Ponta Grossa - Paraná. **ANAIS**. Ponta Grossa: Gestao Estratégica para a competitividade, date. p. 8.

BONETT *et al.* Biocontrole in Vitro de *Colletotrichum musae* por Isolados de *Trichoderma* spp. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 10, 2014.

BOTANY. **Family Aquifoliaceae: holly family**. Disponível em: Acesso em: 14-jan-2016.

BOUILLANT *et al.* Inhibition of *Striga* seed germination associated with sorghum growth promotion by soil bacteria. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III - Sciences de la Vie**, v. 320, n. 2, p. 159-162, 1997.

BRACESCO *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.

BUENSANTEAI *et al.* The plant growth promoting bacterium *Bacillus* sp. CaSUT007 produces phytohormone and extracellular proteins for enhanced growth of cassava. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 42, p. 4949-4954, 2013.

BURTNIK. **Manual del pequeño yerbatero correntino**. AER San Tomé: INTA, 2003.

CANTO. **Avaliação físico-química e tecnológica da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: potencialidade como adjuvante espumógeno**. 2007. 201p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

CASCALES *et al.* Genetic diversity of wild germplasm of "yerba mate" (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay. **Genetica**, v. 142, n. 6, p. 563-73, 2014.

CASSÁN *et al.* **Handbook for Azospirillum - Technical issues and protocols**. Switzerland: Springer, 2015.

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



COELHO *et al.* Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 37, n. p. 153-158, 2001.

CONTRERAS-CORNEJO *et al.* *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579-1592, 2009.

CRESPO *et al.* Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. **Agricultural Sciences**, v. 2, n. 01, p. 16, 2011.

CUÉNOUD *et al.* Molecular phylogeny and biogeography of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae). **Annals of Botany**, v. 85, n. p. 111-122, 2000.

DA SILVA ARAÚJO *et al.* Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. **Applied soil ecology**, v. 64, n. p. 49-55, 2013.

DE OLIVEIRA & ROTTA. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10. , session, 1983, Curitiba. **ANAIS**.Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, date. p. 17-36.

DECHEN *et al.* Micronutrientes. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 327-354.

DELLACASSA & BANDONI. El Mate. **Revista de Fitoterapia**, v. 1, n. 4, p. 10, 2001.

DOBBELAERE *et al.* Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and soil**, v. 212, n. 2, p. 153-162, 1999.

DOBEREINER. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 19, n. 13, p. 83-90, 1984.

DOBEREINER. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 4, n. p. 144-152, 1990.

DOBEREINER. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997.

DUARTE. **Efeito do extrato aquoso (chá) da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre parâmetros oxidativos em ratos diabéticos**. 2010. 31p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

DUCAT & QUINÁIA. Avaliação do teor de minerais da *Ilex paraguariensis* da região Centro-Oeste do Estado do Paraná. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 6, n. 1, p. 31-42, 2009.

EFING. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.)**. 2008. 108p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

ESKIN *et al.* Research Progress and Perspectives of Nitrogen Fixing Bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Monocot Plants. **International Journal of Agronomy**, v. 2014, n. p. 13, 2014.

ESMELINDRO *et al.* Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

FAGAN *et al.* Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja-Revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p. 2007.

FAOSTAT. **Mate – Production of top 5 producers: average 2002-2012**. Disponível em: Acesso em: 07-agosto-2015-2015.

GAIAD. **Alterações na rizosfera e seus reflexos na biomassa, na composição química e na fotossíntese de erva-mate decorrentes do uso de diferentes fontes de nitrogênio**. 2003. 132p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.

GAIAD *et al.* N sources affect growth, nutrient content, and net photosynthesis in maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. p. 689-697, 2006.

GONÇALVES *et al.* Flutuação populacional de *Gyropsylla spegazzianiana* (Hem.: Psyllidae) associada a diferentes formas de cultivo de erva-mate no Rio Grande do Sul. **Biociências**, v. 16, n. 2, p. 149-153, 2008.

GROPPO. **Neotropical Aquifoliaceae**. Disponível em: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Aquifoliaceae.htm>. Acesso em: 14-jan-2016.

HECK & DE MEJIA. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

ISLAM *et al.* Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 1213-1222, 2009.

JAMES *et al.* Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 357, p. 747-760, 2001.

KEYEO *et al.* The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. **Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 267-273, 2011.

KRONVANG *et al.* Effects of policy measures implemented in Denmark on nitrogen pollution of the aquatic environment. **Environmental Science & Policy**, v. 11, n. 2, p. 144-152, 2008.

KÜÇÜK *et al.* Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. **Biologia**, v. 63, n. 2, p. 167-170, 2008.

LARCHER. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.

LEE *et al.* Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis Is Deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* Strains with Mutations in Cytochrome c Biogenesis Genes. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 16, p. 5384-5391, 2004.

LIST. **Aquifoliaceae**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/browse/A/Aquifoliaceae/>>. Acesso em: 14-jan-2016.

LOIZEAU *et al.* Towards an understanding of the distribution of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) on a world-wide scale. v. 55, n. p. 501-520, 2005.

LORENZI. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LOURENÇO *et al.* Avaliação de níveis de nitrogênio sobre a produção de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em Fernandes Pinheiro - PR em latossolo vermelho escuro. **Boletim de Pesquisa Glorestal**, v., <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103230/1/AvaliacaoNiveis0001.pdf>, 34, p. 19, 1997.

LUCY *et al.* Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 1-25, 2004.

MACHADO *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 26, p. 274-288, 2012.

MAHESHWARI. **Bacteria in agrobiolgy: plant nutrient management**. Berlin: Springer, 2011.

MARCHIORO. **Produção de ácido indolacético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

MARIN *et al.* **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999.

MEHNAZ & LAZAROVITS. Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

MUTHUKUMARASAMY *et al.* *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v. 83, n. 2, p. 137-145, 2002.

MUTHUKUMARASAMY *et al.* Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, v. 78, n. 9, p. 1063-1065, 2000.

MYLONA *et al.* Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 869, 1995.

OLIVEIRA *et al.* Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. p. 59-61, 2003.

OLIVEIRA *et al.* Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Quim Nova**, v. 36, n. p. 123-130, 2013.

PEDRAZA *et al.* Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 265-272, 2010.

PIMENTEL *et al.* Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, v. 36, n. 1, p. 128, 2006.

PINTRO *et al.* Crescimento e desenvolvimento da erva-mate em solo sob diferentes níveis de fertilidade. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 3, p. 5, 1998.

PIÑÓN *et al.* *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 345-351, 2002.

PORTUGAL. **Espécies da família Aquifoliaceae.** Disponível em: <<http://jb.utad.pt/familia/aquifoliaceae>>. Acesso em: 14-jan-2016.

PULIDO *et al.* Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RAKOCEVIC *et al.* Intensity of bitterness of processed yerba mate leaves originated in two contrasted light environments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 569-579, 2008.

RAMOS-SOLANO *et al.* Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. **Plant and soil**, v. 334, n. 1-2, p. 189-197, 2010.

REIS *et al.* Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

REIS *et al.* What Is Expected from the Genus *Azospirillum* as a Plant Growth-Promoting Bacteria? In: MAHESHWARI, D. K. **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses** Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 123-138.

RIBEIRO *et al.* Nutrition of mate-tree with ammonium sulfate fertilizer. **CERNE (UFL)**, v. 14, n. p. 204-211, 2008.

ROUSE *et al.* Nitrogen pollution: an assessment of its threat to amphibian survival. **Environmental health perspectives**, v. 107, n. 10, p. 799, 1999.

SARAVANAN *et al.* Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn<sup>2+</sup>) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 235-241, 2007.

SCHERER *et al.* Inheritance studies of caffeine and theobromine content of Mate (*Ilex paraguariensis*) in Misiones, Argentina. **Euphytica**, v. 126, n. 2, p. 203-210, 2002.

SCHUBERT *et al.* Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SCHUSTER & SCHMOLL. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. p. 787-799, 2010.

SIVAN & CHET. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 198-203, 1989.

SOFO *et al.* *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* x *P. canescens*). **Plant Growth Regulation**, v. 65, n. p. 421-425, 2011.

SOUZA. **Chá mate (*Ilex paraguariensis*): Compostos bioativos e relação com atividade biológica**. 2009. 146p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

SOUZA & FERNANDES. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 215-252.

STURION *et al.* Proporção de sexo e produtividade de massa foliar em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Boletim de Pesquisa Florestal**, v., n. n. 30/31, p. 27, 2000.

TAIZ & ZEIGER. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TARRANT *et al.* A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. p. 967-980, 1978.

TEIXEIRA *et al.* **Nitrogenase: bioquímica do processo de FBN**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1998.

TORTORA *et al.* *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275-286, 2011.

TORTORA *et al.* Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 279-290, 2012.

TRACHTENBERG & OGG. Potential for reducing nitrogen pollution through improved agronomic practices. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 30, n. 6, p. 1109-1118, 1994.

TRETER *et al.* Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Ilex paraguariensis* ("Mate") fruits. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 6, p. 914-918, 2010.

VALDUGA *et al.* Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. **Boletim do centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 15, n. 1, p. 12, 1997.

WALSH. Physiology of the legume nodule and its response to stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 637-655, 1995.

WATSON & DALLWITZ. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. Disponível em: <<http://delta-intkey.com/angio/www/aquifoli.htm>>. Acesso em: 08-jan-2016.

WOLF. **Estimativa da exportação de nutrientes foliares em diferentes tipos de poda na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 2005. 77p. Dissertation (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

## Anexos

Tabela 1. Dados brutos utilizados em análises e coletados de plantas de *Ilex paraguariensis* tratadas com água (controle).

Matriz	Planta	Comprimento (cm)				Massa fresca (g)			
		Total	Radicular	Aéreo/ radicular	Aéreo/ radicular	Total	Radicular	Aéreo/ radicular	Aérea/ radicular
	1	13,50	6,80	6,70	0,99	0,61	0,14	0,47	3,36
	2	15,90	7,14	8,76	1,23	1,63	0,67	0,96	1,43
	3	14,10	6,00	8,10	1,35	0,90	0,20	0,70	3,50
	4	18,90	9,50	9,40	0,99	1,98	0,83	1,15	1,39
	5	14,40	6,30	8,10	1,29	0,95	0,35	0,60	1,71
	6	16,60	9,40	7,20	0,77	1,73	0,87	0,86	0,99
	7	15,80	7,10	8,70	1,23	1,41	0,33	1,08	3,27
	8	14,60	9,60	5,00	0,52	0,84	0,43	0,41	0,95
	9	16,60	9,00	7,60	0,84	1,34	0,63	0,71	1,13
13	10	19,10	9,00	10,10	1,12	1,78	0,78	1,00	1,28
	11	20,00	11,00	9,00	0,82	1,41	0,57	0,84	1,47
	12	13,30	5,80	7,50	1,29	1,31	0,39	0,92	2,36
	13	12,70	7,40	5,30	0,72	0,51	0,15	0,36	2,40
	14	14,30	8,00	6,30	0,79	1,14	0,54	0,60	1,11
	15	11,90	6,30	5,60	0,89	0,51	0,14	0,37	2,64
	16	17,70	10,40	7,30	0,70	1,20	0,66	0,54	0,82
	17	15,60	9,20	6,40	0,70	1,51	0,82	0,69	0,84
	18	10,80	5,30	5,50	1,04	0,98	0,37	0,61	1,65
	19	14,00	8,40	5,60	0,67	0,58	0,27	0,31	1,15
	20	12,20	6,80	5,40	0,79	0,31	0,07	0,24	3,43
	1	15,60	9,80	5,80	0,59	0,85	0,42	0,43	1,02
	2	17,60	10,60	7,00	0,66	1,79	0,85	0,94	1,11
	3	13,80	7,80	6,00	0,77	1,33	0,66	0,67	1,02
	4	13,10	8,20	4,90	0,60	0,49	0,26	0,23	0,88
	5	17,20	10,30	6,90	0,67	1,37	0,62	0,75	1,21
	6	15,40	8,50	6,90	0,81	1,19	0,56	0,63	1,13
	7	18,00	9,50	8,50	0,89	1,35	0,57	0,78	1,37
9	8	18,20	10,50	7,70	0,73	1,24	0,49	0,75	1,53
	9	12,00	7,10	4,90	0,69	0,64	0,35	0,29	0,83
	10	17,00	11,50	5,50	0,48	0,62	0,30	0,32	1,07
	11	14,00	9,10	4,90	0,54	0,63	0,40	0,23	0,58
	12	18,90	13,20	5,70	0,43	0,92	0,44	0,48	1,09
	13	18,30	11,00	7,30	0,66	1,04	0,41	0,63	1,54
	14	13,50	6,20	7,30	1,18	0,91	0,33	0,58	1,76
	15	11,30	5,90	5,40	0,92	0,58	0,16	0,42	2,63
	16	14,00	7,70	6,30	0,82	0,85	0,37	0,48	1,30

17	16,30	8,50	7,80	0,92	1,26	0,52	0,74	1,42
18	14,30	8,70	5,60	0,64	0,68	0,36	0,32	0,89
19	13,50	6,40	7,10	1,11	0,48	0,10	0,38	3,80
20	11,50	6,20	5,30	0,85	0,77	0,39	0,38	0,97
21	11,90	6,50	5,40	0,83	0,54	0,31	0,23	0,74
22	12,00	6,60	5,40	0,82	0,51	0,25	0,26	1,04

Tabela 2. Dados brutos utilizados em análises e coletados de plantas de *Ilex paraguariensis* tratadas com *Azospirillum brasilense*.

Matriz	Planta	Comprimento (cm)			Massa fresca (g)				
		Total	Radicular	Aéreo/ radicular	Total	Radicular	Aéreo/ radicular	Aérea/ radicular	
14	1	15,30	8,90	6,40	0,72	1,24	0,78	0,46	0,59
	2	15,20	10,00	5,20	0,52	1,23	0,68	0,55	0,81
	4	17,20	10,10	7,10	0,70	1,15	0,43	0,72	1,67
	5	16,60	9,00	7,60	0,84	1,29	0,64	0,65	1,02
	6	11,70	6,00	5,70	0,95	0,56	0,08	0,48	6,00
	7	14,00	8,70	5,30	0,61	0,69	0,34	0,35	1,03
	8	16,90	9,50	7,40	0,78	1,89	0,75	1,14	1,52
	9	17,50	10,10	7,40	0,73	1,62	0,83	0,79	0,95
	10	15,50	9,10	6,40	0,70	0,91	0,37	0,54	1,46
	11	16,00	9,00	7,00	0,78	1,24	0,60	0,64	1,07
	12	17,00	10,70	6,30	0,59	1,69	0,80	0,89	1,11
	13	18,00	9,40	8,60	0,91	1,11	0,42	0,69	1,64
	14	15,90	8,40	7,50	0,89	1,94	0,87	1,07	1,23
	15	11,00	6,20	4,80	0,77	0,27	0,08	0,19	2,38
	16	17,50	9,80	7,70	0,79	1,96	0,92	1,04	1,13
	17	14,70	10,00	4,70	0,47	0,70	0,31	0,39	1,26
	18	14,20	8,20	6,00	0,73	1,05	0,51	0,54	1,06
	19	14,00	8,10	5,90	0,73	0,67	0,31	0,36	1,16
	20	12,20	7,50	4,70	0,63	0,39	0,18	0,21	1,17
	21	9,60	6,70	2,90	0,43	0,14	0,05	0,09	1,80
	22	14,80	9,20	5,60	0,61	0,40	0,20	0,20	1,00
	10	1	16,20	8,90	7,30	0,82	1,91	0,86	1,05
2		15,80	7,50	8,30	1,11	1,39	0,62	0,77	1,24
3		18,70	10,10	8,60	0,85	1,48	0,70	0,78	1,11
4		14,00	7,00	7,00	1,00	1,02	0,51	0,51	1,00
5		17,50	10,70	6,80	0,64	2,18	1,01	1,17	1,16
6		17,80	9,90	7,90	0,80	1,40	0,76	0,64	0,84
7		18,50	9,50	9,00	0,95	1,99	1,10	0,89	0,81
8		17,00	10,80	6,20	0,57	1,31	0,73	0,58	0,79
9		15,90	9,80	6,10	0,62	1,03	0,46	0,57	1,24
10		16,00	6,60	9,40	1,42	1,48	0,46	1,02	2,22



11	11,60	5,90	5,70	0,97	0,69	0,35	0,34	0,97
12	16,20	9,10	7,10	0,78	1,37	0,63	0,74	1,17
13	16,00	9,70	6,30	0,65	1,39	0,50	0,89	1,78
14	12,50	6,60	5,90	0,89	0,70	0,40	0,30	0,75
15	11,60	6,70	4,90	0,73	0,41	0,18	0,23	1,28
16	18,10	10,90	7,20	0,66	1,20	0,68	0,52	0,76
17	11,70	4,50	7,20	1,60	0,60	0,23	0,37	1,61
18	10,50	5,30	5,20	0,98	0,27	0,09	0,18	2,00
19	15,60	9,60	6,00	0,63	1,08	0,57	0,51	0,89
20	10,10	4,00	6,10	1,53	0,29	0,09	0,20	2,22
21	8,20	3,40	4,80	1,41	0,21	0,06	0,15	2,50
22	10,30	6,70	3,60	0,54	0,23	0,11	0,12	1,09

Tabela 3. Dados brutos utilizados em análises e coletados de plantas de *Ilex paraguariensis* tratadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Matriz	Planta	Comprimento (cm)				Massa fresca (g)			
		Total	Radicular	Aéreo/		Total	Radicular	Aérea/	
				Aéreo	radicular			Aéreo	radicular
15	1	16,50	10,20	6,30	0,62	1,11	0,56	0,55	0,98
	2	19,20	12,10	7,10	0,59	1,52	0,86	0,66	0,77
	3	16,00	8,20	7,80	0,95	1,19	0,52	0,67	1,29
	4	17,10	10,40	6,70	0,64	0,88	0,49	0,39	0,80
	5	17,70	9,20	8,50	0,92	1,62	0,74	0,88	1,19
	6	17,00	8,30	8,70	1,05	1,48	0,58	0,90	1,55
	7	15,90	8,60	7,30	0,85	2,29	0,80	1,49	1,86
	8	12,80	5,20	7,60	1,46	0,65	0,24	0,41	1,71
	9	19,60	11,70	7,90	0,68	2,35	0,99	1,36	1,37
	10	17,70	8,60	9,10	1,06	1,78	0,89	0,89	1,00
	11	21,00	9,80	11,20	1,14	2,85	1,29	1,56	1,21
	12	16,50	9,80	6,70	0,68	1,44	0,66	0,78	1,18
	13	17,50	8,90	8,60	0,97	1,28	0,41	0,87	2,12
	14	15,70	10,40	5,30	0,51	1,97	0,92	1,05	1,14
	15	16,30	9,00	7,30	0,81	1,48	0,73	0,75	1,03
	16	18,00	9,00	9,00	1,00	1,34	0,43	0,91	2,12
	17	17,90	9,60	8,30	0,86	1,76	0,84	0,92	1,10
	18	18,00	8,30	9,70	1,17	1,20	0,54	0,66	1,22
	19	20,20	11,60	8,60	0,74	2,42	1,23	1,19	0,97
	20	16,60	8,90	7,70	0,87	1,40	0,69	0,71	1,03
	21	17,40	7,80	9,60	1,23	1,49	0,63	0,86	1,37
11	1	18,10	9,80	8,30	0,85	1,72	0,74	0,98	1,32
	2	16,60	9,50	7,10	0,75	1,14	0,57	0,57	1,00
	3	13,70	7,80	5,90	0,76	0,86	0,50	0,36	0,72

4	18,00	10,30	7,70	0,75	0,95	0,51	0,44	0,86
5	17,40	9,50	7,90	0,83	1,96	0,94	1,02	1,09
6	16,10	9,20	6,90	0,75	1,09	0,48	0,61	1,27
7	13,80	7,00	6,80	0,97	1,25	0,40	0,85	2,13
8	16,10	8,10	8,00	0,99	1,71	0,78	0,93	1,19
9	20,50	11,60	8,90	0,77	2,08	0,96	1,12	1,17
10	16,90	10,70	6,20	0,58	0,88	0,47	0,41	0,87
11	24,00	13,60	10,40	0,76	1,71	0,74	0,97	1,31
12	12,50	6,80	5,70	0,84	0,99	0,63	0,36	0,57
13	15,60	8,80	6,80	0,77	1,13	0,57	0,56	0,98
14	22,00	13,30	8,70	0,65	2,05	0,94	1,11	1,18
15	19,00	10,00	9,00	0,90	1,56	0,71	0,85	1,20
16	17,80	8,80	9,00	1,02	1,93	1,01	0,92	0,91
17	18,50	10,40	8,10	0,78	1,95	1,06	0,89	0,84
18	15,40	8,30	7,10	0,86	1,07	0,65	0,42	0,65
19	18,00	9,70	8,30	0,86	1,71	0,69	1,02	1,48
20	17,40	9,20	8,20	0,89	1,83	0,81	1,02	1,26
21	21,10	11,50	9,60	0,83	2,84	1,06	1,78	1,68
22	14,60	9,20	5,40	0,59	1,96	1,00	0,96	0,96

Tabela 4. Dados brutos utilizados em análises e coletados de plantas de *Ilex paraguariensis* tratadas com *Trichoderma harzianum*.

Matriz	Planta	Comprimento (cm)				Massa fresca (g)			
		Total	Radicular	Aéreo	Aéreo/ radicular	Total	Radicular	Aéreo	Aérea/ radicular
16	1	16,00	8,00	8,00	1,00	1,06	0,47	0,59	1,26
	2	15,00	8,50	6,50	0,76	0,49	0,39	0,10	0,26
	3	15,20	7,90	7,30	0,92	1,12	0,58	0,54	0,93
	4	15,30	9,70	5,60	0,58	0,75	0,40	0,35	0,88
	5	15,50	8,10	7,40	0,91	1,03	0,60	0,43	0,72
	6	12,00	7,80	4,20	0,54	0,40	0,17	0,23	1,35
	7	11,00	5,20	5,80	1,12	0,61	0,29	0,32	1,10
	8	16,70	7,60	9,10	1,20	0,87	0,33	0,54	1,64
	9	16,10	8,70	7,40	0,85	1,52	0,88	0,64	0,73
	10	15,50	8,40	7,10	0,85	1,05	0,57	0,48	0,84
	11	14,80	9,00	5,80	0,64	0,92	0,50	0,42	0,84
	12	14,20	9,30	4,90	0,53	1,12	0,58	0,54	0,93
	13	15,10	8,30	6,80	0,82	0,97	0,40	0,57	1,43
	14	16,40	9,70	6,70	0,69	1,18	0,47	0,71	1,51
	15	13,00	8,40	4,60	0,55	0,49	0,25	0,24	0,96
	16	16,60	9,90	6,70	0,68	2,79	1,28	1,51	1,18
	17	10,70	6,00	4,70	0,78	0,33	0,15	0,18	1,20
	18	16,70	8,70	8,00	0,92	1,35	0,63	0,72	1,14

	19	15,50	9,50	6,00	0,63	1,05	0,43	0,62	1,44
	20	17,30	10,10	7,20	0,71	1,89	0,96	0,93	0,97
	21	15,00	8,50	6,50	0,76	0,74	0,43	0,31	0,72
	1	14,40	7,50	6,90	0,92	0,80	0,42	0,38	0,90
	2	14,20	8,00	6,20	0,78	0,62	0,23	0,39	1,70
	3	15,60	8,70	6,90	0,79	0,98	0,37	0,61	1,65
	4	13,00	7,90	5,10	0,65	0,64	0,31	0,33	1,06
	5	15,30	8,30	7,00	0,84	1,06	0,57	0,49	0,86
	6	16,50	8,40	8,10	0,96	1,54	0,73	0,81	1,11
	7	14,70	7,30	7,40	1,01	0,98	0,40	0,58	1,45
	8	19,20	10,80	8,40	0,78	2,47	1,27	1,20	0,94
	9	15,10	8,90	6,20	0,70	1,09	0,50	0,59	1,18
	10	17,10	10,60	6,50	0,61	0,97	0,45	0,52	1,16
12	11	11,20	7,50	3,70	0,49	1,28	0,65	0,63	0,97
	12	14,20	8,50	5,70	0,67	0,81	0,44	0,37	0,84
	13	18,50	10,20	8,30	0,81	2,04	1,03	1,01	0,98
	14	16,50	9,40	7,10	0,76	1,71	0,76	0,95	1,25
	15	18,10	9,50	8,60	0,91	1,52	0,68	0,84	1,24
	16	18,80	10,50	8,30	0,79	1,93	1,00	0,93	0,93
	17	16,80	10,30	6,50	0,63	1,06	0,52	0,54	1,04
	18	17,90	10,50	7,40	0,70	1,44	0,68	0,76	1,12
	19	17,20	8,80	8,40	0,95	1,02	0,45	0,57	1,27
	20	9,30	5,70	3,60	0,63	0,13	0,05	0,08	1,60
	21	14,00	7,50	6,50	0,87	0,82	0,45	0,37	0,82
	22	16,40	8,80	7,60	0,86	1,08	0,40	0,68	1,70

Tabela 5. Média e desvio padrão dos parâmetros avaliados neste estudo. AB, tratamento com inoculação de *Azospirillum brasilense*. GD, tratamento com inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. TH, tratamento com inoculação de *Trichoderma harzianum*. CT, tratamento com inoculação com água, controle. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística (ANOVA).

	Parâmetro	AB		GD		TH		CT	
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Comprimento (cm)	Total	14,76 b	2,72	17,39 a	2,29	15,29 b	2,15	15,29 b	2,43
	Radicular	8,32 b	1,91	9,50 a	1,61	8,63 b	1,25	8,63 b	2,20
	Aéreo	6,44 b	1,38	7,88 a	1,29	6,67 b	1,31	6,67 b	1,90
	Aéreo/radicular	0,81 a	0,27	0,85 a	0,19	0,78 a	0,16	0,84 a	0,23
Massa fresca (g)	Total	1,06 b	0,56	1,58 a	0,51	1,11 b	0,53	1,11 b	0,43
	Radicular	0,49 b	0,28	0,73 a	0,23	0,54 b	0,27	0,54 b	0,21
	Aérea	0,57 b	0,30	0,85 a	0,32	0,57 b	0,28	0,57 b	0,25
	Aérea/radicular	1,39 ab	0,85	1,20 b	0,37	1,11 b	0,31	1,57 a	0,86

Figura 1. Comparação entre comprimento total (azul), radicular (amarelo) e aéreo (verde) tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle).

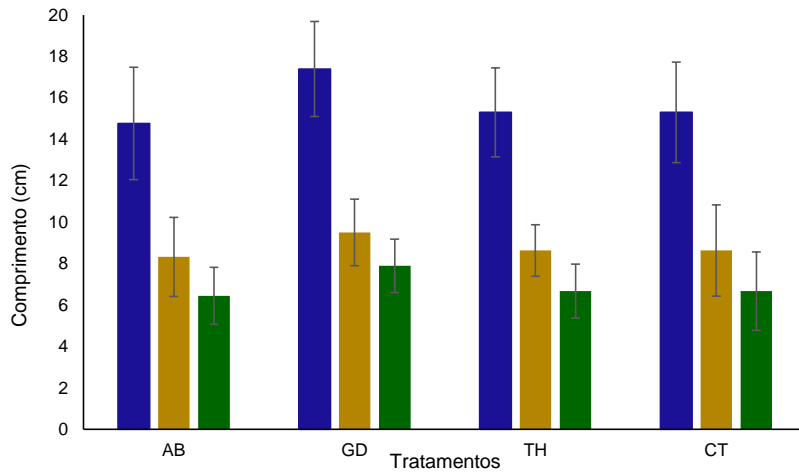


Figura 2. Comparação entre comprimento total (azul), radicular (amarelo) e aéreo (verde) dos tratamentos AB (inoculação com *Azospirillum brasilense*), GD (inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*), TH (inoculação com *Trichoderma harzianum*) e CT (inoculação com água, controle).

