

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Resposta da cultura do trigo aos novos endófitos, *Achromobacter* e
Zoogloea, em condições de campo**

VALÉRIA MARINO RODRIGUES SALA

**Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Agronomia. Área de
concentração: Microbiologia Agrícola.**

PIRACICABA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Valéria Marino Rodrigues Sala
Engenheiro Agrônomo

**Resposta da cultura do trigo aos novos endófitos, *Achromobacter* e *Zoogloea*,
em condições de campo**

Orientadora:

Prof^a. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Sala, Valéria Marino Rodrigues

Resposta da cultura do trigo aos novos endófitos, *Achromobacter* e *Zoogloea*, em condições de campo / Valeria Marino Rodrigues Sala. - - Piracicaba, 2006.

139 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio 2. Enzimas 3. Genótipos
4. Hormônios vegetais 5. Nitrogênio 6. Produtividade 7. Trigo I. Título

CDD 633.11

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A minha mãe

Valquíria Ap. Marino

OFEREÇO

A meu marido

Andrea Sala

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso pela compreensão e incentivo para realização deste trabalho.
- À Dra. Adriana Parada Dias da Silveira pela participação em todas as etapas dessa pesquisa e principalmente pela amizade e companherismo. Meu muito obrigada!
- Ao Dr. José Guilherme, sem o qual este trabalho não seria possível.
- Ao Dr. Paulo B. Gallo pelos ensaios de campo realizados em Mococa.
- À pesquisadora Dra. Maria Luiza Colognesi O. Lombardi por ter me introduzido na pesquisa científica na área de Microbiologia Agrícola.
- À Dra. Sueli Santos Freitas pela amizade e pelos esclarecimentos, sempre que necessários.
- Ao Instituto Agrônomo de Campinas pela oportunidade. Aos funcionários: Maria Leonilde, Tereza, Rosana, Carlos e Norberto que tanto contribuíram para conclusão deste trabalho. As amigas e colegas de laboratório, pelo apoio, amizade e pelo agradável convívio.
- Ao Dr Luis Antonio Gallo, Dra Neusa Nogueira de Lima, e aos técnicos Enio e Mônica pelos muitos esclarecimentos prestados.
- À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro prestado.
- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.
- À todos aqueles que, de uma maneira ou outra, prestaram o seu apoio e incentivo para realização desse trabalho. Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
Referências.....	22
2 <i>ACHROMOBACTER INSOLITUS</i> E <i>ZOOGLOEA RAMIGERA</i> , DUAS NOVAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE TRIGO	25
Resumo.....	25
Abstract.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.2 Desenvolvimento.....	28
2.2.1 Material e métodos.....	28
2.2.1.1 Linhagens bacterianas.....	28
2.2.1.2 Identificação de bactérias por análise de seqüências do DNA ribossomal 16S.....	28
2.2.1.3 Análise da colonização radicular por microscopia.....	29
2.2.2 Resultados e discussão.....	31
2.3 Conclusões.....	45
Referências.....	46
3 RESPOSTA DE GENÓTIPOS DE TRIGO À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CONDIÇÕES DE CAMPO.....	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
3.1 Introdução.....	52
3.2 Desenvolvimento.....	54
3.2.1 Material e métodos.....	54
3.2.2 Resultados e discussão.....	55
3.2.2.1 Produção de biomassa e acúmulo de nitrogênio.....	55

3.2.2.1.1 Experimento –Campinas.....	55
3.2.2.1.2 Experimento –Mococa.....	58
3.2.2.2 Produtividade de grãos.....	60
3.2.2.2.1 Experimento –Campinas.....	60
3.2.2.2.2 Experimento –Mococa.....	60
3.2.2.3 Considerações gerais.....	65
3.3 Conclusões.....	67
Referências.....	69
4 NOVAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA CULTURA DO TRIGO EM INTERAÇÃO COM A ADUBAÇÃO NITROGENADA, NO CAMPO.....	71
Resumo.....	71
Abstract.....	71
4.1 Introdução.....	72
4.2 Desenvolvimento.....	74
4.2.1 Material e métodos.....	74
4.2.2 Resultados e discussão.....	75
4.3 Conclusões.....	84
Referências.....	85
5 PRODUÇÃO DE INDÓIS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TRIGO.....	88
Resumo.....	88
Abstract.....	88
5.1 Introdução.....	89
5.2 Desenvolvimento.....	91
5.2.1 Material e métodos.....	91
5.2.1.1 Análise da produção de indóis.....	91
5.2.1.2 Experimento de campo.....	91
5.2.2 Resultados e discussão.....	93
5.2.2.1 Análise da produção de indóis.....	93
5.2.2.2 Experimento de campo.....	95
5.3 Conclusões.....	105

Referências.....	106
6 INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO DE <i>ACROMOBACTER INSOLITUS</i> , NOVO ENDÓFITO DE TRIGO, NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO.....	110
Resumo.....	110
Abstract.....	110
6.1 Introdução.....	111
6.2 Desenvolvimento.....	112
6.2.1 Material e métodos.....	112
6.2.1.1 Análise da colonização pela contagem do número de bactérias no solo e nas raízes.....	113
6.2.1.2 Atividade da enzima redutase do nitrato.....	113
6.2.1.3 Atividade da enzima sintetase da glutamina.....	114
6.2.1.4 Análise do teor de clorofila.....	114
6.2.2 Resultados e discussão.....	115
6.2.2.1 Quantificação de bactérias diazotróficas.....	115
6.2.2.2 Metabolismo do nitrogênio.....	116
6.2.2.3 Crescimento da planta.....	120
6.3 Conclusões.....	127
Referências.....	128
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	130
ANEXOS.....	133

RESPOSTA DA CULTURA DO TRIGO AOS NOVOS ENDÓFITOS, *ACHROMOBACTER* E *ZOOGLOEA*, EM CONDIÇÕES DE CAMPO

RESUMO

Este é o primeiro relato da presença de bactérias diazotróficas dos gêneros *Achromobacter* e *Zoogloea* como endófitas de plantas de trigo, que foram identificadas pela análise das seqüências do DNA ribossomal 16S. Com o objetivo de estudar a localização dos isolados: IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera* nas plantas de trigo, foi realizado um experimento em condições axênicas. Após 15 dias da inoculação, as plantas foram observadas em microscópio eletrônico e visualizou-se a presença das bactérias externamente nas raízes e internamente no córtex, na região de alongamento.

Para estudar possíveis benefícios propiciados por estes isolados à cultura do trigo em condições de campo, foram instalados dois experimentos no ano de 2002, com dois genótipos de trigo (ITD-19 e IAC-370) e três doses de N. As análises foram realizadas no estágio de quatro folhas e de perfilhamento. A inoculação promoveu maior massa de matéria seca e N acumulado e aumentou a produtividade de grãos, principalmente na presença de adubo nitrogenado adicional, porém, revertendo em lucro para o agricultor. As respostas variaram em relação ao local de cultivo.

Em 2003, foi realizado outro experimento muito semelhante aos anteriores, entretanto, as análises foram realizadas no estágio perfilhamento e de maturidade fisiológica. A inoculação promoveu benefícios à cultura do trigo independentemente do genótipo utilizado, ou seja, aumento do N acumulado no grão, com a inoculação do isolado IAC-AT-8, e da produtividade de grãos na maior dose de N, com o isolado IAC-HT-11.

Os benefícios propiciados às plantas pela inoculação de bactérias diazotróficas podem estar relacionados à capacidade de síntese de fitormônios. Por isso instalou-se um experimento no ano de 2005 com o objetivo de relacionar a capacidade de síntese de indóis com os possíveis benefícios à cultura do trigo em condições de campo. Os isolados diferiram quanto a quantidade de indóis que sintetizaram, entretanto, houve

benefícios para a cultura, principalmente com a adição de adubo nitrogenado, demonstrando que outros mecanismos podem ser responsáveis pelas respostas positivas.

Assim, foi realizado um experimento em casa de vegetação para estudar a influência da inoculação no metabolismo do nitrogênio das plantas e avaliar a colonização em substrato não esterilizado. Os isolados foram marcados com resistência a antibióticos. Após 40 dias da inoculação todos os isolados estavam presentes no interior das raízes, entretanto, não foram detectados no solo. O isolado IAC-HT-11, influenciou o metabolismo do nitrogênio das plantas, propiciando maior atividade das enzimas redutase do nitrato e sintetase da glutamina, e maior teor de clorofila, resultando no aumento da eficiência de utilização do N.

Apesar das respostas terem sido variáveis, em todos os experimentos realizados foram obtidas respostas positivas à inoculação do isolado IAC-HT-11 de *Achromobacter insolitus*, na presença de adubo nitrogenado adicionado. A inoculação é uma prática não onerosa, portanto, viável economicamente, aumentando a produtividade de grãos e gerando lucro para o agricultor.

Palavras chave: Nitrogênio, Genótipos, Produtividade, Indóis, Atividade enzimática.

WHEAT PLANTS RESPONSE TO NEW ENDOPHYTES, *ACHROMOBACTER* AND *ZOOGLOEA*, UNDER FIELD CONDITIONS

ABSTRACT

This study reports for the first time the endophytic nature of *Achromobacter* and *Zoogloea* in wheat plants, that were identified by 16S rDNA gene sequence analyses. To find out the localization of the bacterial cells (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*) in/on wheat plants, an experiment was set up under axenic conditions. Fifteen days after inoculation, the plants were observed under electron microscope. All the strains could be visualized on the external part of the root and in the inner part at the elongation zone, in the cortex cells.

Two field experiments were carried out in year of 2002, with the aim of evaluating the benefits from inoculation of these strains in wheat plants, with two wheat genotypes (ITD-19 and IAC-370) and three levels of nitrogen fertilizer. The plants were evaluated at four leaves and at tillering stage. Inoculated plants presented increases in dry matter, N accumulation and grain yield, especially in combination with N fertilizer, generating financial profits for the farmer. The responses to inoculation varied according to the location.

A field experiment was carried out, in year of 2003, with the same experimental set up used at the previous year. However, the plants were evaluated at tillering stage and at maturity stage. Grain yield and the main yield components were evaluated at harvest. Independent of the cultivar or the nitrogen dose, plants inoculated with the strain IAC-AT-8 presented increases in grain N accumulation and, at the highest nitrogen dose, the strain IAC-HT-11 increased grain yield.

The plants' benefits due to the inoculation of endophytic diazotrophic bacteria may also result from their indole synthesis, a field experiment was carried out to find out which had been the main mechanisms for improvement of plant growth and yield, in 2005. The employed strains produced variable amounts of indoles, however, the inoculation brought benefits to wheat plants, mainly in the presence of added N,

demonstrated that others mechanisms could be acting for the positive responses to inoculation.

In this way, a greenhouse experiment was carried out with the aim of evaluating the influence of inoculation on nitrogen metabolism in wheat plants, and the colonization in unsterilized substratum. The strains were selectively marked with antibiotic resistance to. Forty days after inoculation, all three strains had been established in the interior of the roots, however, they could not be detected in the soil. The strain IAC-HT-11 influenced the N metabolism of the plants, increased the nitrate reductase and glutamine synthetase activities, and the chlorophyll content, causing higher efficiency in N utilization.

In spite of the great variability of the inoculation response, IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*, generated the greatest yield increase when combined with nitrogen fertilizer. Inoculation of diazotrophic bacteria is an inexpensive technique, that is economically sound, promoting the increase in grain yield and generating financial profits for the farmer.

Key words: Nitrogen, Genotypes, Grain yield, Indoles, Enzymatic activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Árvore filogenética demonstrando a relação dos isolados IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12, e linhagens de outras bactérias relacionadas com base em seqüências do DNA ribossomal 16S. A linhagem tipo *Clostridium acetivum* DSM 1496 (Y18183) foi utilizada como “outgroup”(1000 Bootstrap).....31
- Figura 2 - Microscopia Eletrônica de Varredura de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-AT-8, *Azospirillum brasiliense*. (A) Localização da colonização na raiz. 5230x. (B) Presença da bactéria na célula do córtex. 3000x. (C) Colonização da parte externa da raiz, orientação polar das células em relação à raiz e presença de muco. 3940x. As barras representam: (A) 20 µm, (B e C) 10 µm.....34
- Figura 3 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-AT-8, *Azospirillum brasiliense*. Bactéria na parte externa da raiz (A), e em células não intactas (B) na região do córtex. As barras representam 2 µm.36
- Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*. (A) Localização da colonização na raiz. 5350x. (B) Presença da bactéria na célula do córtex. 3000x. (C) Colonização da parte externa da raiz e presença de muco. 3000x. As barras representam: (A) 20 µm,(B e C) 10 µ.....39
- Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*. (A) Bactéria confinada em colônias na parte externa da raiz. (B) Presença de grande número de células bacterianas no espaço intercelular na região do córtex da raiz. As barras representam 2 µm.....40

- Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-12, *Zoogloea ramigera*. (A) Localização da colonização na raiz. 5090x. (B) Presença da bactéria nas células do córtex. 3000x. (C) Colonização da parte externa da raiz e intensa formação de muco. 3000x. As barras representam: (A) 20 μm , (B e C) 10 μm 42
- Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-12, *Zoogloea ramigera*. (A) Colonização intracelular da célula do córtex da raiz. (PHB) inclusões de poli-hidroxibutirato nas células bacterianas. (B) Presença da bactéria no espaço intercelular das células do córtex. As barras representam 2 μm43
- Figura 8 - Massa de matéria seca da parte aérea e N acumulado no estágio de perfilhamento no genótipo IAC370 (A e B) e ITD19 (B e C) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (\blacklozenge), IAC-HT-11 (\blacksquare), IAC-HT-12(\blacktriangle) e testemunha sem inoculação (\bullet) em Campinas-SP. Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.....57
- Figura 9 - Massa de matéria seca da parte aérea e N acumulado no estágio de Perfilhamento nos genótipos IAC-370 (A e B) e ITD19 (B e C) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (\blacklozenge), IAC-HT-11 (\blacksquare), IAC-HT-12(\blacktriangle) e testemunha sem inoculação (\bullet), em Mococa-SP. Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.....59
- Figura 10 - Produtividade do genótipo IAC370 (A) e ITD-19 (B) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (\blacklozenge), IAC-HT-11 (\blacksquare), IAC-HT-12(\blacktriangle) e testemunha sem inoculação (\bullet), em Campinas-SP. Asterisco – difere

- significativamente pelo teste de Duncan 5%, isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.61
- Figura 11 - Massa de mil grãos sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação, em Campinas-SP. Letras iguais não diferem pelo teste de Duncan a 5%.....62
- Figura 12 - Produtividade dos genótipos IAC370 (A) e ITD19 (B) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●), em Mococa-SP. Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.63
- Figura 13 - Massa de matéria seca da parte aérea no estágio de perfilhamento no genótipo IAC370 em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.76
- Figura 14 - Quantidade acumulada (A) e índice de eficiência de utilização (B) do nitrogênio na parte aérea no estágio de perfilhamento em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.77
- Figura 15 - Produtividade de grãos de trigo em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.....80

- Figura 16 - Número de espigas m^{-2} na dose de 120 kg ha^{-1} de N sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8, IAC-HT-11, IAC-HT-12 e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem pelo teste de Duncan a 5%.....82
- Figura 17 - Massa de matéria seca e N acumulado na parte aérea de plantas de trigo, no estágio de perfilhamento, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....96
- Figura 18 - Atividade da enzima redutase do nitrato na parte aérea de plantas de trigo, no estágio de perfilhamento, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....97
- Figura 19 - N acumulado na espiga, no estágio de maturidade fisiológica, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....100
- Figura 20 - Massa de cem grãos e número de grãos por espiga de plantas de trigo, na ocasião da colheita, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.....101
- Figura 21 - Atividade da enzima redutase do nitrato (A) e sintetase da glutamina (B) nas folhas, em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N.117
- Figura 22 - Teor de clorofila foliar sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.....119

- Figura 23 - Quantidade acumulada de N nas folhas e colmos (A), e nas espigas (B) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N.....121
- Figura 24 - Índice de eficiência de utilização do N nas folhas e nos colmos (A), e nas espigas (B) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N.....122
- Figura 25 - Massa de matéria seca das folhas e colmos sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.....123
- Figura 26 - Massa de matéria seca das espigas em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N.....124
- Figura 27 - Massa de matéria fresca da raiz em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N.....125
- Figura 28. - Raízes de trigo sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação.....126

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Massa de matéria seca da parte aérea e N acumulado de dois genótipos de trigo, no estágio de quatro folhas, do experimento de campo instalado em Campinas, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação.....56
- Tabela 2 - Massa de matéria seca, quantidade acumulada e índice de eficiência de utilização do N, no estágio de maturidade fisiológica, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação.....78
- Tabela 3 - Massa de 100 grãos, N acumulado após o perfilhamento, número de grãos espiga⁻¹, número de espigas m⁻², número de grãos m⁻², índice de colheita para massa de matéria seca e índice de colheita para nitrogênio, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação.....81
- Tabela 4 - Produção de indóis por bactérias diazotróficas endofíticas após 24 e 48 hs da inoculação, utilizando-se meio de cultura com e sem a adição de L-triptofano (trp).....94
- Tabela 5 - Massa de matéria seca e N acumulado da parte aérea, no estágio de maturidade fisiológica, em função de três doses de N, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação.....98
- Tabela 6 - Produtividade de grãos, em função de três doses de N, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação.....102
- Tabela 7 - N fixado no estágio de perfilhamento e maturidade fisiológica, em função de três doses de N, com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em relação ao tratamento testemunha.....104

1 INTRODUÇÃO

Os cereais são a base da alimentação para a maioria da população do mundo, principalmente para as mais carentes. É estimado que, aproximadamente, 60% da alimentação é constituída por arroz, trigo e milho (REIS et al., 2000)

O trigo é a 2ª cultura em grãos a nível mundial em produção. Entretanto, no Brasil, a cultura do trigo exige intensa pesquisa agrônômica devido a sua origem, uma região ecologicamente distinta. Baggio (1999) afirma que os trigos brasileiros são conhecidos por apresentarem os melhores genes a nível mundial para tolerância à acidez do solo, resistência à ferrugem e outras doenças fúngicas. No entanto, a demanda crescente pelas culturas alimentícias, torna necessária a continuidade da pesquisa em diversos aspectos.

Somente as culturas do trigo, milho e arroz consomem aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados utilizados no mundo (LADHA et al., 2005). Portanto, devido à extensa área ocupada pelos cereais, aproximadamente 5 vezes a das leguminosas, a pesquisa de bactérias associadas a essas culturas torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte de suas necessidades de nitrogênio possa ser suprida pela inoculação.

A partir das observações pioneiras de Döbereiner e Day (1976) de que o uso de meios semi-sólidos é a condição ideal para o isolamento de diazotróficos “in vitro”, esse método tem sido empregado extensivamente no isolamento e caracterização de microrganismos fixadores associados a diferentes plantas e condições de clima e solo. Observou-se que tais diazotróficos ocupam preferencialmente sítios onde a concentração de O_2 é limitada. Esta descoberta revolucionou e ampliou as pesquisas sobre todos os aspectos da fixação biológica do nitrogênio nas associações entre diazotróficos e não leguminosas, denominadas comumente de simbiose associativa ou fixação de N_2 associativa (BALDANI et al., 1997).

As bactérias do gênero *Azospirillum* foram identificadas inicialmente como *Spirillum lipoferum* por Döbereiner e Day (1976), isoladas a partir de raízes de *Digitaria*. Posteriormente, foi proposto o gênero *Azospirillum* com duas espécies: *A. lipoferum* e *A. brasiliense*. Atualmente, outras espécies foram descritas, entretanto, *A. lipoferum* e

A. brasiliense são as espécies de maior relevância isoladas de cereais (BALDANI et al., 1997). Entre todas as espécies de *Azospirillum* conhecidas, *A. brasiliense* constitui a mais caracterizada fisiologicamente e através de métodos moleculares, e ainda, é a espécie mais estudada associada a plantas de trigo.

Algumas espécies do gênero *Azospirillum* possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e são aptas a colonizar todo o interior das mesmas, enquanto outras apenas colonizam a camada de mucilagem ou células do córtex danificadas das raízes (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Parece evidente que bactérias diazotróficas endofíticas possuem vantagens que o interior da planta pode proporcionar, como maior acesso a fontes de carbono produzidas pela planta, uma menor pressão de O₂, essencial para o funcionamento da nitrogenase e portanto, para que ocorra a FBN, ou ainda, pela menor competição com outros microrganismos do solo (LODEWYCKX et al., 2002). Entretanto, em condições de campo, a multiplicação e o estabelecimento na rizosfera são fatores importantes para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas, uma vez que precisam competir com os microrganismos nativos já existentes no solo (BALDANI et al., 1986).

Tratando-se de bactérias diazotróficas, acreditava-se que a fixação de N₂ na ecto e endorrizosfera ou dentro de raízes e a liberação de parte do nitrogênio fixado para a planta fosse o principal modo de ação de *Azospirillum* spp., sobre o hospedeiro. Entretanto, os efeitos estimuladores de crescimento de planta ocorreram em vários estudos, onde se observam respostas positivas à inoculação dessas bactérias (BODDEY; DÖBEREINER, 1988), sem entretanto, ocorrer incremento no teor de N da planta.

As bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Azospirillum* são amplamente estudadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (BASHAN; DE-BASHAN, 2005).

Existem muitas evidências que múltiplos mecanismos estão interagindo para obtenção dos benefícios propiciados às plantas às quais estas bactérias estão associadas. BPCPs podem auxiliar por diversos mecanismos na nutrição nitrogenada das culturas, entre os quais, produção de hormônios, que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, possibilitando uma exploração de

um maior volume de solo (BASHAN; HOGUIN, 1997; ZAIED et al., 2003), aumento do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo (BODDEY et al., 1986) e ainda, pela fixação biológica do N₂ (FBN) (INIGUEZ et al., 2004).

Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas, pois parece haver alguma especificidade na compatibilidade entre a bactéria e a planta hospedeira (REIS et al., 2000). Possivelmente, devido a diferenças na composição dos exsudatos e ácidos orgânicos excretados pelas raízes, os quais estão envolvidos no processo de quimiotaxia das bactérias em direção às raízes. Antonyuk e Evseeva (2006) demonstraram que as lectinas, produzidas pelas plantas de trigo, são excretadas pelas raízes e atuam como sinais moleculares para associação com bactérias do gênero *Azospirillum*, e são fundamentais para determinar a especificidade genotípica na interação planta-bactéria.

De acordo com Bashand e Levanony (1990), aumentos moderados, em torno de 20%, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, seriam considerados comercialmente significativos na agricultura moderna, desde que consistentes. Em geral, o efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. sobre a produção situa-se em torno de 10 a 30% sobre o controle não inoculado e, em alguns casos, valores mais elevados, de 50 a 250% têm sido mencionados (BODDEY; DÖBEREINER, 1988).

Existem muitos relatos de respostas positivas da inoculação de bactérias diazotróficas associadas à cultura do trigo (DALLA SANTA et al., 2004; ROESCH et al., 2005), havendo, entretanto, outros relatos em que não houve efeito da inoculação (OGÜT et al., 2005). Mertens e Hess (1984), utilizando uma estirpe de *Azospirillum*, em três anos de experimento de campo, obtiveram aumento na produtividade de grãos, que variou de 8 a 32%, sendo que essa variação ocorreu entre os anos e dentro do mesmo ano de cultivo. Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda se observam respostas muito variáveis, ou seja, falta de reprodutibilidade dos resultados, o que tem limitado a produção de um inoculante comercial (DOBBELAERE et al., 2002).

Segundo Yanni et al. (1997), a comunidade de diazotróficos cultiváveis é extremamente variada e somente poucas bactérias foram identificadas e caracterizadas. A diversidade da comunidade endofítica em plantas de trigo, ao

contrário da comunidade rizosférica, é maior nos cultivares modernos, os quais foram melhorados geneticamente em relação aos cultivares antigos ou selvagens (GERMIDA; SICILIANO, 2001). Isso sugere uma adaptação da microbiota, e/ou, uma maior especificidade planta-bactéria, o que torna de extrema importância a pesquisa de novas bactérias endofíticas associativas.

Os objetivos do trabalho foram:

1. Identificação molecular de três isolados bacterianos obtidos de raízes de trigo desinfetadas superficialmente, os quais se sobressaíram como promotores de crescimento dessas plantas em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005) e em casa de vegetação com substrato esterilizado (SALA, 2002).
2. Observar a localização da colonização em plantas de trigo.
3. Avaliar, em condições de campo, o efeito da inoculação em dois genótipos de trigo, sob três níveis de adubação nitrogenada, em duas localidades.
4. Avaliar a capacidade de síntese de indóis pelas bactérias, relacionando o efeito da inoculação, em condições de campo, com os possíveis benefícios propiciados às plantas.
5. Estudar a viabilidade econômica da inoculação na cultura do trigo.
6. Avaliar a capacidade de colonização em substrato não esterilizado.
7. Avaliar a influência da inoculação nas enzimas do metabolismo do nitrogênio de plantas de trigo.

Referências

- ANTONYUK, L.P., EVSEEVA, N.V. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. **Microbiology**, Moskva, v. 75, p. 470-475, 2006.
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p. 35-46, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford v.29, p.922-928, 1997.
- BAGGIO, M. I. Genética e novas biotecnologias no melhoramento de trigo. In: CUNHA, G. R. (Org.). **Trigo, 500 anos no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. p. 90-95 (Embrapa Trigo. Documentos, 10).
- BASHAN, Y.; de-BASHAN, L.E. Plant growth-promoting. In: HILLEL, D., **Encyclopedia of soil in the environment**, Oxford : Elsevier, 2005, v. 1, p 103-115.
- BASHAND, Y.; HOGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.
- BASHAND, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, p.591-605, 1990.
- BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. On nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.109-121, 1986.
- BODDEY, R.M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.53-65, 1988.
- DALLA SANTA, O R., HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, p. 843-850, 2004.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v.36, p.284-297, 2002.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1., Washington, 1976. **Proceedings...** Washington: Washington State University, 1976. p.518-538.

GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. **Biology and Fertility of Soil**, Oxford, v.33, p.410-415, 2001.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

LADHA, J.K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T. J.; SIX, J. ; KESSEL, C.V. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. **Advances in Agronomy**, Oxford, v. 87, p. 85-156, 2005.

LODEWYCKX, C.; VANGRONVELD, J.; PORTEUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; van der LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 21, p. 583-606, 2002.

MERTENS, T.; HESS, D. Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of temperate region. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, p. 87-99, 1984.

OGÜT, M.; AKDAG, C.; DUZDEMIR, O.; SAKIN, A. M. Single and double inoculation with *Azospirillum/Tricoderma*: the effects on dry bean and wheat. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v. 41, p.262-272, 2005.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v.19, n.3, p.227-247, 2000.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O ; SELBACH, P.A, SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 1201-1204, 2005.

STEENHOUDT, O.; VADERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, p.487-506, 2000.

ZAIED, K.A.; EL-HADY, A H.; AFIFY, A H.; NASSEF, M. A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Pakistan, v.4, p.344-358, 2003.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; BRUIJN, F.D.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* *bv.* *Trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p.99-114, 1997.

2. *ACHROMOBACTER INSOLITUS* E *ZOOGLOEA RAMIGERA*, DUAS NOVAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE TRIGO

Resumo

Este trabalho relata pela primeira vez a presença das bactérias diazotróficas pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Zoogloea* como endófitas de plantas de trigo, as quais foram identificadas pela análise das seqüências do DNA ribossomal 16S. A bactéria IAC-AT-8 isolada em meio de cultura NFb, idealizado para o isolamento do gênero *Azospirillum*, foi identificada como *Azospirillum brasiliense*. Entretanto, os isolados IAC-HT-11 e IAC-HT-12 obtidos em meio de cultura JNFb, indicado para o isolamento de *Herbaspirillum* spp., foram identificados como pertencentes às espécies *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera*, respectivamente. Com o objetivo de estudar a localização desses isolados nas plantas de trigo, foi realizado um experimento em condições axênicas. Após 15 dias da inoculação, as plantas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura, utilizando-se a técnica da criofratura, e de transmissão. Observou-se que todos os isolados empregados estavam presentes na parte externa das raízes e na parte interna na região de alongamento, nas células do córtex, não sendo observados na endoderme ou na região dos feixes vasculares. Porém, não foram observados colonizando as folhas de trigo.

Termos para indexação: Identificação, Microscopia eletrônica, Colonização radicular.

Abstract

This study reports for the first time the presence of diazotrophic bacteria belonging to the genera *Achromobacter* and *Zoogloea* as endophytes in wheat plants, which were identified by the analysis of 16S ribosomal DNA sequences. The bacterium IAC-AT-8, isolated in NFb culture medium, devised for isolation of the genus *Azospirillum*, was identified as *Azospirillum brasiliense*. However, isolates IAC-HT-11 and IAC-HT-12, obtained in JNFb culture medium, which is indicated for *Herbaspirillum*

spp. isolation, were identified as belonging to the species *Achromobacter insolitus* and *Zoogloea ramigera*, respectively. In order to study where these isolates are located in wheat plants, an experiment was conducted under axenic conditions. Fifteen days after inoculation, the plants were observed under the scanning electron microscope, using the cryofracture technique, and under the transmission electron microscope. It was observed that all isolates used were present on the external part of the roots and in the inner part at the elongation region, in cortex cells, but not in the endodermis or in the vascular bundle region. However, they were not observed colonizing wheat leaves.

Index terms: Identification, Electron microscope, Root colonization.

2.1 Introdução

As plantas são fundamentais como fonte energética para a comunidade e a diversidade de microrganismos no solo, na rizosfera, ou ainda, dentro da própria planta como endófitos. O principal substrato para o metabolismo dos microrganismos quimiorganotróficos no solo provém dos produtos da rizodeposição, que são compostos por exsudatos, lisados, mucilagem, secreções e células mortas. O crescimento da microbiota é estimulado pela contínua deposição de substratos orgânicos pelas raízes, que são rapidamente assimiláveis pelos microrganismos (LYNCH; WHIPPS, 1990). Pesaro e Widner (2006) demonstraram que as populações de bactérias promotoras de crescimento pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, no solo, sob uma cultura de trigo, diferiam das populações encontradas sob uma cultura de trevo. E, ainda, Germida et al. (1998) observaram que os grupos de bactérias encontrados dentro das raízes de plantas de canola não ocorriam nas plantas de trigo cultivadas na mesma localidade, demonstrando que as populações de bactérias endofíticas são fortemente dependentes da planta hospedeira.

As bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas podem ser agrupadas em três categorias: organismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (BALDANI et al., 1997). A denominação de “bactéria endofítica” significa

que a bactérias é capaz de viver no interior das plantas sem que, no entanto, induza uma resposta de defesa à sua presença (REINHOLD; HUREK, 1998).

As respostas positivas à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas podem ser atribuídas à localização, mais protegida, pois, diferem das bactérias diazotróficas rizosféricas, que competem com os outros microrganismos do solo por fontes de carbono e liberam a maior parte do N fixado apenas após sua morte.

Muitos gêneros de bactérias estão sendo isolados de plantas desinfetadas superficialmente, demonstrando a diversidade da microbiota endofítica. Zinniel et al. (2002) obtiveram 853 isolados de bactérias endofíticas de várias plantas, inclusive trigo. Os gêneros que efetivamente colonizaram às plantas quando re-inoculados foram identificados como *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* e *Microbacterium*. Também, Iniguez et al. (2004) demonstraram que um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, originalmente isolado de plantas de milho, colonizava o interior das raízes de plantas de trigo, suprimindo suas necessidades de nitrogênio pela fixação biológica.

Segundo Yanni et al. (1997), a comunidade de diazotróficos cultiváveis é extremamente variada e somente poucas bactérias foram identificadas e caracterizadas. A diversidade da comunidade endofítica em plantas de trigo, ao contrário da comunidade rizosférica, é maior nos cultivares modernos, os quais foram melhorados geneticamente comparada aos cultivares antigos ou selvagens (GERMIDA; SICILIANO, 2001). Isso sugere uma adaptação da microbiota, e/ou, uma maior especificidade planta-bactéria, o que torna de extrema importância a pesquisa de novas bactérias endofíticas associativas.

Os três isolados bacterianos obtidos de raízes de trigo desinfetadas superficialmente, os quais, se sobressaíram como promotores de crescimento dessas plantas em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005) e em casa de vegetação com substrato esterilizado (SALA, 2002), foram identificados pela análise das seqüências do DNA ribossomal 16S. Adicionalmente, verificou-se sua localização utilizando-se microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e métodos

2.2.1.1 Linhagens bacterianas

Os isolados foram obtidos de raízes de trigo desinfetadas superficialmente, cultivado de experimento de campo em solo adubado com N, descrito em Sala et al. (2005). As estirpes foram isoladas, utilizando-se meio de cultura semi-sólido sem nitrogênio, sendo estas: estirpe IAC-AT-8 isolada em meio de cultura NFb, idealizado para isolamento de *Azospirillum* spp., e as estirpes IAC-HT-11 e IAC-HT-12 foram isoladas em meio JNFb, indicado para o isolamento de *Herbaspirillum* spp. (DÖBEREINER et al., 1995).

2.2.1.2 Identificação de bactérias por análise de seqüências do DNA ribossomal 16S

A caracterização molecular das bactérias endofíticas de trigo foi baseada na análise de seqüências do DNA ribossomal 16S. O DNA genômico foi obtido pelo método de extração descrito por Pitcher *et al.* (1989) com modificações.

Fragmentos do DNA ribossomal foram amplificados pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído da amostra. Os *primers* utilizados para a reação de PCR foram p27f e p1401r, homólogos às extremidades conservadas do gene rRNA 16S de bactérias. Para as reações de PCR foram utilizados 0.4 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs (GE Health Care), 2 Unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 100 ng de DNA genômico. O programa para amplificação do gene RNAr 16S seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 10 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C; 30 seg de anelamento de 62°C a 57°C (diminuição de 0,5°C a cada ciclo) e 2 min a 72°C para extensão, seguido de 20 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C; 2 min de anelamento a 57°C e 2 min a 72°C para extensão.

Os fragmentos de rDNA 16S amplificados foram purificados em Coluna GFX (GE Health Care) e submetidos diretamente ao sequenciamento em seqüenciador

automático MegaBACE 1000 (GE Health), usando *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace*, de acordo com as recomendações do fabricante. Os *primers* utilizados para o seqüenciamento foram 10f, 765f, 782r e 1100r.

As seqüências parciais de DNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as seqüências de DNA ribossomal 16S de organismos representados nas bases de dados do RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA; <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>; MAIDAK et al., 2001) e Genbank (<http://www.ncbi.gov>). Foram então selecionadas seqüências de organismos relacionados à seqüência obtida para realização das análises filogenéticas. As seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 2.0 (KUMAR et al., 2001). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 2.0.

As seqüências obtidas foram depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.gov>) sendo essas: DQ 386149 (IAC-AT-8), DQ386150 (IAC-HT-11) e DQ389143 (IAC-HT-12).

2.2.1.3 Análise da colonização radicular por microscopia

O ensaio foi realizado utilizando-se tubos de ensaio de 300 ml contendo solução de Hoagland e Arnon (1950) sem N e 0,6% de ágar. As bactérias foram inoculadas antes da solidificação do ágar, após atingir a fase log de crescimento em meio NFb (IAC-AT-IAC-AT-8) e JNFb (IAC-HT-11e IAC-HT-12), sendo utilizado 1mL de inóculo por tubo. As sementes foram desinfetadas utilizando-se HgCl₂ 0,1% (RADWAN et al., 2004). Após a desinfetação superficial, as sementes foram pré-germinadas em placas de Petri, contendo meio BDA para verificar a ausência de contaminantes, e só então transferidas para os tubos de ensaio. Este ensaio foi realizado em uma sala de

crescimento de plantas (fotoperíodo: 16 horas, temperatura: 22-25⁰C) por um período de 15 dias, quando as plantas foram coletadas para observação em microscópio eletrônico de varredura e de transmissão.

- Microscópio Eletrônico de Varredura

Foi utilizado o método da criofratura conforme Kitajima e Leite (1997). As amostras de raízes e folhas foram fixadas em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2; CaCl₂ 0,001M) por 12 horas e substituída por glicerol 30%, durante 30 minutos. Após resfriamento dos acessórios em nitrogênio líquido, as amostras foram induzidas à clivagem. As pequenas criofraturas obtidas foram transferidas para microtubos contendo uma solução de tetróxido de ósmio 1% onde permaneceram por 3 horas. Seguiram-se 3 lavagens e foi realizada a desidratação em um série crescente de acetona (25%; 50%; 75%; 90%, 100%). Em seguida as amostras foram expostas ao aparelho de secagem ao ponto crítico (Balzers CPD 030), colocadas em suportes de alumínio (stubs) e metalizadas com ouro durante 180 segundos no evaporador (MED 010 Balzers). As amostras foram observadas ao microscópio eletrônico Zeiss LEO 435 VP, onde imagens digitalizadas foram obtidas.

- Microscópio Eletrônico de Transmissão

Pequenas porções de tecidos de raiz foram fixadas em solução de Karnovsky modificada: glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 48 horas, lavadas em tampão cacodilato 0,1M (3x 15 min.) e pós fixadas por 1 hora com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M. Após rápidas lavagens com solução salina 0,9% foram coradas “in bloco” com acetato de uranila 2,5% em água “overnight” e desidratadas com séries crescentes de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, 100%). Posteriormente os espécimes foram incluídos em resina Spurr a 70 °C por 48 horas. Os cortes ultrafinos (60-90nm) foram depositados em grades de cobre recobertas com formvar, contrastados com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo. Esses cortes foram examinados ao microscópio eletrônico Zeiss EM-900.

2.2.2 Resultados e discussão

A análise das folhas e raízes das plantas de trigo em microscópio eletrônico de varredura (MEV), utilizando a técnica da criofatura, possibilitou a identificação das regiões colonizadas pelas bactérias, regiões estas que foram selecionadas para posterior análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET).

Os três isolados bacterianos empregados puderam ser identificados na parte externa e interna na região de alongamento das raízes, porém, não foram observados colonizando as folhas de trigo. Outra característica comum aos três isolados utilizados é que estavam presentes somente nas células do córtex da raiz, não sendo observados na endoderme ou na região dos feixes vasculares.

No presente estudo, a bactéria IAC-AT-8 isolada em meio de cultura NFb foi identificada como uma estirpe de *Azospirillum brasiliense*, baseada na análise de seqüências do DNA ribossomal 16S (Figura 1). A seqüência parcial do DNA ribossomal 16S do isolado IAC-AT-8 apresentou entre 98 e 100% de similaridade com seqüências de rDNA 16S de linhagens de *Azospirillum* sp. e *Azospirillum brasiliense*. Além disso, apresentou similaridades mais baixas, entre 96 e 97%, com seqüências de rDNA 16S de linhagens de outras espécies, entre elas, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum halopraeferens* e *Azospirillum amazonense*. A árvore filogenética (Figura 1) agrupou o isolado IAC-AT-8 no cluster fortemente relacionado com as espécies *A. brasiliense*, *A. lipoferum* e *A. halopraeferens* (FANI et al., 1995).

Alguns isolados pertencentes ao gênero *Azospirillum* possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e são aptos a colonizar todo o interior das mesmas, enquanto outros, apenas colonizam a camada de mucilagem ou células danificadas no córtex das raízes (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Ainda, nossos dados corroboram com os relatos de Bashan et al. (2004) cujo estudo demonstrou que certas estirpes de *Azospirillum* sp. colonizam o interior das raízes do trigo.

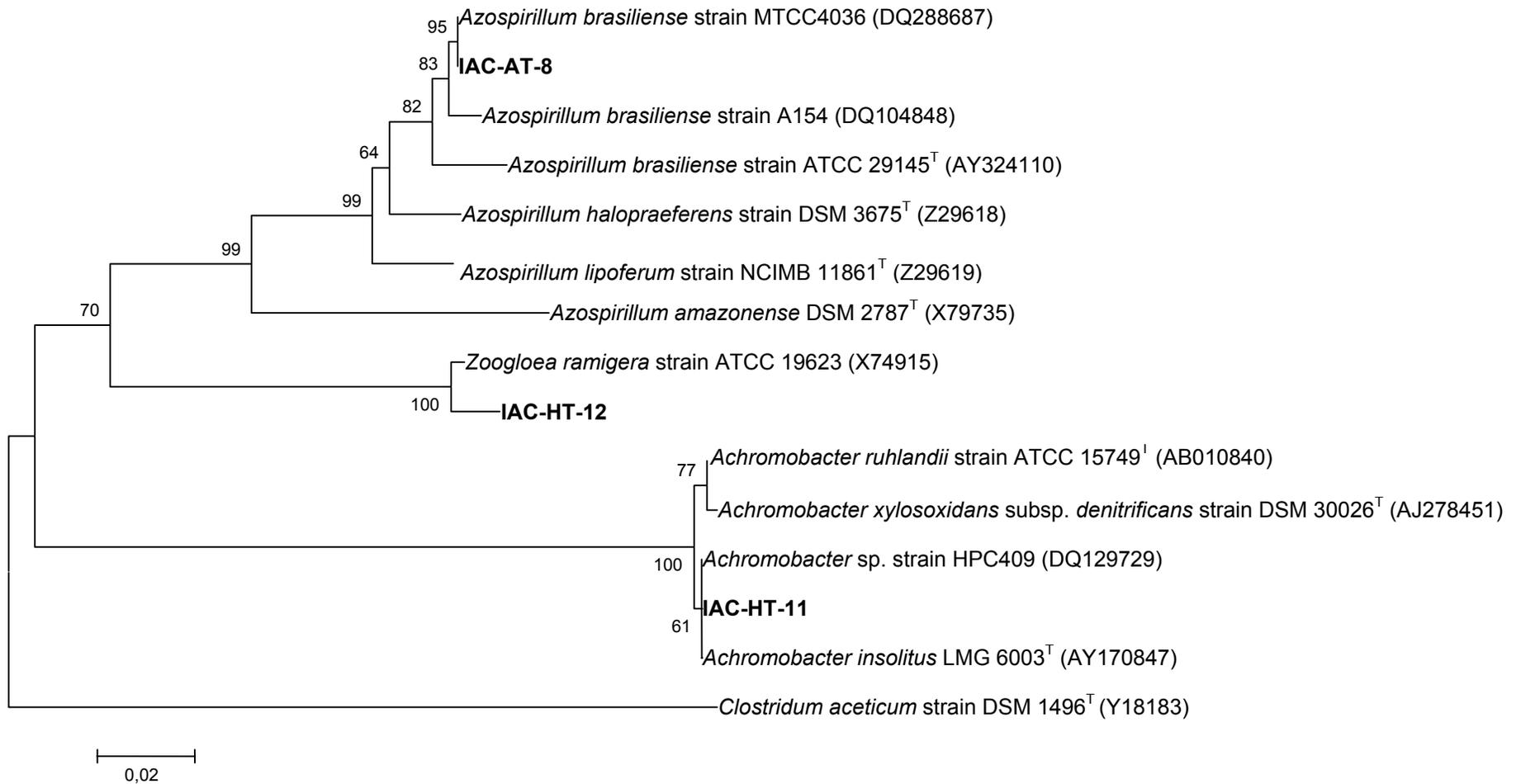


Figura 1 - Árvore filogenética demonstrando a relação dos isolados IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12, e linhagens de outras bactérias relacionadas com base em seqüências do DNA ribossomal 16S. A linhagem tipo *Clostridium acetivum* DSM 1496 (Y18183) foi utilizada como “outgroup”(1000 Bootstrap)

As bactérias do gênero *Azospirillum* (α -proteobactéria, ordem Rhodospirillales, família Rhodospirillaceae) foram identificadas inicialmente como *Spirillum lipoferum* por Döbereiner e Day (1976), isoladas a partir de raízes de *Digitaria*. Posteriormente, foi proposto o gênero *Azospirillum* com duas espécies: *A. lipoferum* e *A. brasiliense*. Atualmente, muitas outras espécies foram descritas como *A. amazonense* (MAGALHÃES et al.,1983), isolada de gramíneas forrageiras e pupunha nativa da região Amazônica, *A. halopraeferans* (REINHOLD et al.,1987), isolada de gramíneas do Paquistão, *A. irakense* (KHAMMAS et al.,1989) isolada de plantas de arroz no Iraque, *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001) isolada da gramínea *Miscanthus*, entre outras.

Na análise das raízes utilizando o MEV (Figura 2), o isolado IAC-AT-8, identificado como uma estirpe de *Azospirillum brasiliense*, colonizou intensamente a parte externa das raízes próxima às extremidades, observando-se a presença de uma substância mucosa, já relatada em trabalhos anteriores como exopolissacarídeos (GERK et al.,2000), a qual está relacionada com a adesão da bactéria à superfície da raiz.

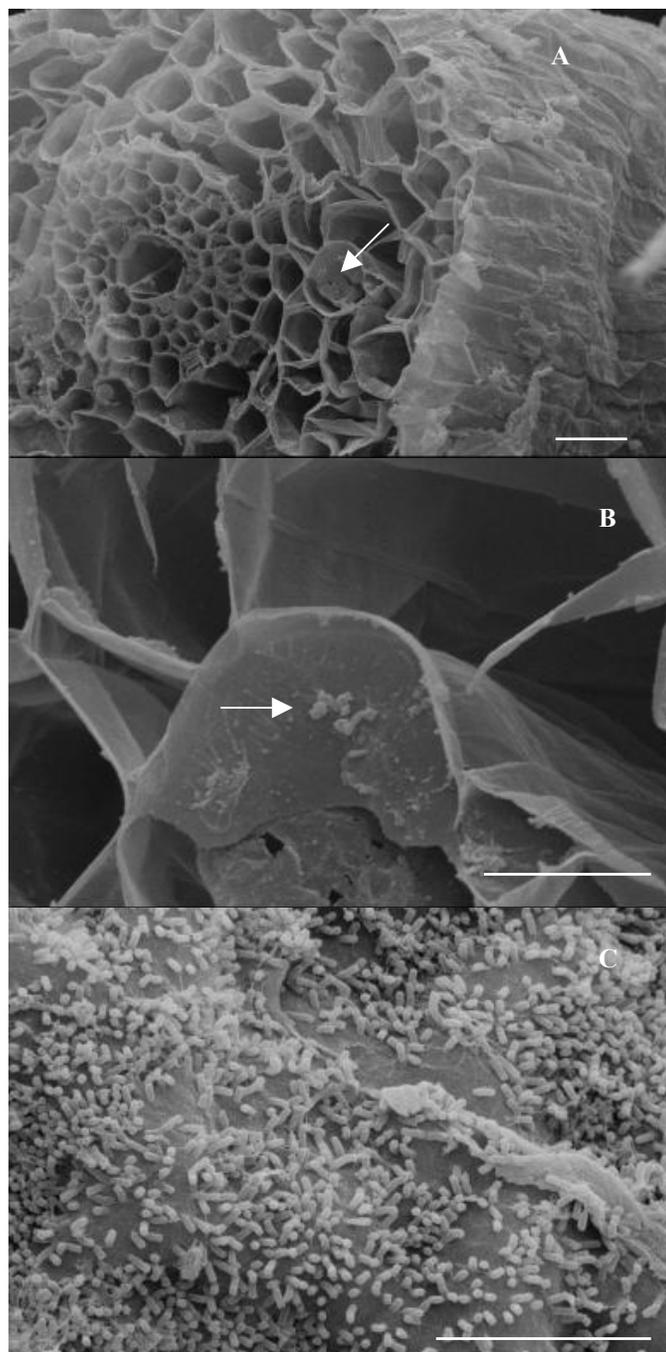


Figura 2 - Microscopia Eletrônica de Varredura de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-AT-8, *Azospirillum brasiliense*. (A) Localização da colonização na raiz. 5230x. (B) Presença da bactéria na célula do córtex. 3000x. (C) Colonização da parte externa da raiz, orientação polar das células em relação à raiz e presença de muco. 3940x. As barras representam: (A) 20 μm , (B e C) 10 μm

Observou-se uma orientação polar das células do isolado IAC-AT-8 em relação às raízes, provavelmente devido a presença de flagelos polares que as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* possuem, sendo importantes no processo de adesão das bactérias às raízes.

Geralmente, essas bactérias são encontradas nas células do córtex nos espaços intercelulares na região de alongamento ou nos pêlos radiculares. Levanony et al. (1989), observaram que uma estirpe de *Azospirillum brasiliense* colonizava intensamente a região externa da coifa das raízes de plantas de trigo, entretanto não foi encontrada no interior dessa região, onde as células estão organizadas de forma mais compacta e apresentam poucos espaços intercelulares. Ainda, Liu et al. (2003), demonstraram que uma estirpe de *Azospirillum brasiliense* colonizava a região do córtex das raízes de plantas de milho, sendo que a maioria das células estava presente na superfície das raízes, sendo raramente encontradas no interior das mesmas. No presente trabalho, poucas células foram observadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura na região do córtex (Figura 2), também não foi possível observar a presença do isolado IAC-AT-8 em células intactas no interior das raízes nessa região utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (Figura 3).

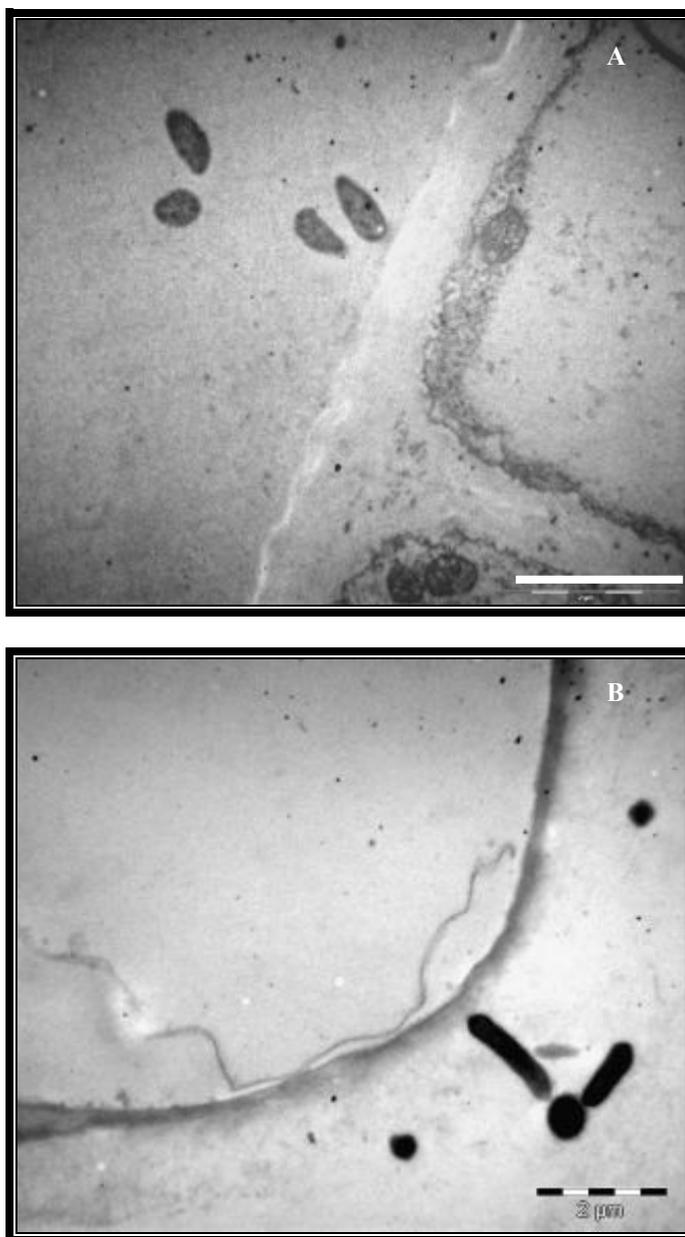


Figura 3 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-AT-8, *Azospirillum brasiliense*. Bactéria na parte externa da raiz (A), e em células não intactas (B) na região do córtex. As barras representam 2 µm

Os isolados IAC-HT-11 e IAC-HT-12 obtidos em meio de cultura JNFb, indicado para o isolamento de *Herbaspirillum* sp. (DÖBEREINER et al., 1995), foram identificados como pertencentes às espécies *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera*, respectivamente (Figura 1).

A seqüência parcial do DNA ribossomal 16S do isolado IAC-HT-11 apresentou 100% de similaridade com a seqüência de DNA ribossomal de 16S da linhagem tipo de *Achromobacter insolitus*, além de similaridades mais baixas, entre 98 e 99% com outras espécies de *Achromobacter*, entre elas, *Achromobacter* sp., *Achromobacter xilosoxidans* subsp. *denitrificans*, *Achromobacter xilosoxidans* subsp. *xilosoxidans* e *Achromobacter ruhlandii*. A árvore filogenética (Figura 1) agrupou isolado IAC-HT-11 com a linhagem tipo de *Achromobacter insolitus*.

Goerz e Pengra (1960) demonstraram a capacidade de uma estirpe do gênero *Achromobacter* de fixar nitrogênio em cultura pura de células, utilizando N¹⁵. Bertrand et al. (2000), utilizando meio de cultura NFb, idealizado para o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum*, isolaram de raízes não desinfetadas superficialmente de plantas de canola, uma estirpe pertencente ao gênero *Achromobacter*, a qual denominaram como rizobactéria promotora de crescimento, uma vez que proporcionou aumento no crescimento das raízes.

O gênero *Achromobacter* (β -proteobactérias, ordem Burkholderiales, família Alcaligenaceae) foi identificado geneticamente por Yabuuchi e Yanno (1981), sendo composto, inicialmente, somente por uma única espécie, denominada *A. xylosoxidans*. Outras espécies pertencentes ao gênero *Alcaligenes* foram reclassificadas como *Achromobacter* (YABUUCHI et al., 1998), sendo essas, *A. ruhlandii* e *A. piechaudii*.

Recentemente, foi isolada uma estirpe de *A. piechaudii* de um solo que não era cultivado por mais de cem anos, de um leito de rio, na estação da seca, em Israel. Esse isolado proporcionou resistência à salinidade (MAYAK et al., 2004a) e resistência ao estresse hídrico (MAYAK et al., 2004b) à plantas de tomate.

A espécie *Achromobacter insolitus* (in.so'li.tus L. masc. Adj. Insolitus = não usual, incomum) foi descrita por Coenye et al. (2003) sendo a linhagem tipo isolada de ferimento na perna humana, embora seja considerado que este microrganismo é raramente encontrado em amostras clínicas de humanos.

Após 15 dias da inoculação, utilizando o MEV (Figura 4), somente foram encontradas poucas células do isolado IAC-HT-11, indentificado como *Achromobacter insolitus*, no exterior das raízes, na região de alongamento, não apresentando orientação polar e escassa produção de substância mucosa. As células apresentam formato de bastonete, porém muito arredondados, sendo que esta característica se intensifica quando observados dentro das raízes pela técnica de criofratura.

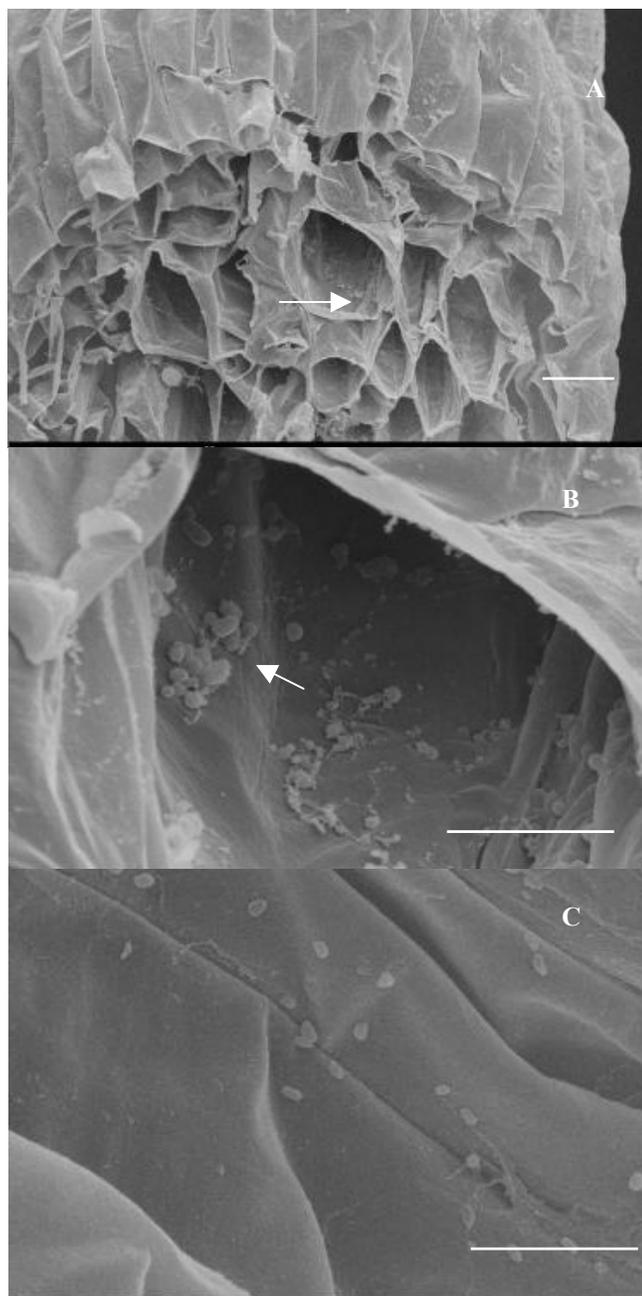


Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*. (A) Localização da colonização na raiz. 5350x. (B) Presença da bactéria na célula do córtex. 3000x. (C) Colonização da parte externa da raiz e presença de muco. 3000x. As barras representam: (A) 20 μm , (B e C) 10 μm

Em microscópio eletrônico de transmissão (Figura 5) observou-se que o isolado IAC-HT-11 colonizou intensamente a região interna das raízes na região de alongamento, estando presente principalmente nos espaços intercelulares.

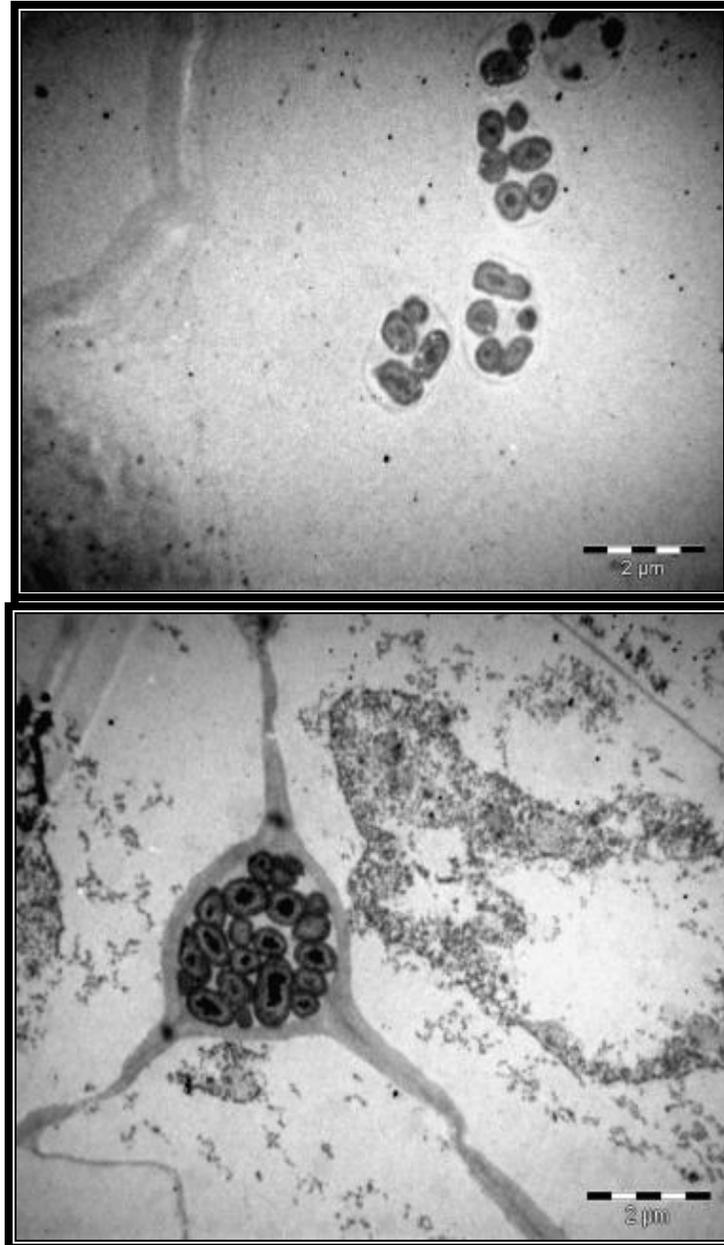


Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-11, *Achomobacter insolitus*. (A) Bactéria confinada em colônias na parte externa da raiz. (B) Presença de grande número de células bacterianas no espaço intercelular na região do córtex da raiz. As barras representam 2 µm

A seqüência parcial do DNA ribossomal 16S do isolado IAC-HT-12 apresentou 96% de similaridade com seqüências de rDNA 16S de isolados de *Zoogloea ramigera*. A árvore filogenética (Figura 1) construída com as seqüências parciais do DNA ribossomal 16S apresenta um cluster bastante consistente onde o isolado IAC-HT-12 foi alocado com linhagens de *Zoogloea ramigera*, incluindo a linhagem tipo.

O gênero *Zoogloea* pertence ao grupo das β -proteobactérias, ordem Rodocyclales, família Rodocyclaceae e foi proposto por Itzigsohn (1968), contendo somente uma espécie denominada *Z. ramigera*. Atualmente, outras duas espécies foram descritas, sendo estas *Z. resiniphila* (MOHN et al., 1999) e *Z. oryzae* (XIE; YOKOTA, 2006). Esta última foi isolada do solo sob uma cultura de arroz.

O isolado IAC-HT-12, identificado como *Zoogloea ramigera*, estava presente em grande número na superfície das raízes (Figura 6), e como nos outros dois isolados pesquisados, essa colonização ocorreu na região de alongamento. A orientação das células bacterianas em relação à raiz parece ser principalmente polar, e observou-se uma densa formação de muco na adesão das mesmas com as raízes. Já foi demonstrado que isolados de *Zoogloea ramigera* produzem polissacarídeos extracelulares que aderem às paredes celulares (NORBEG; ENFORS, 1982).

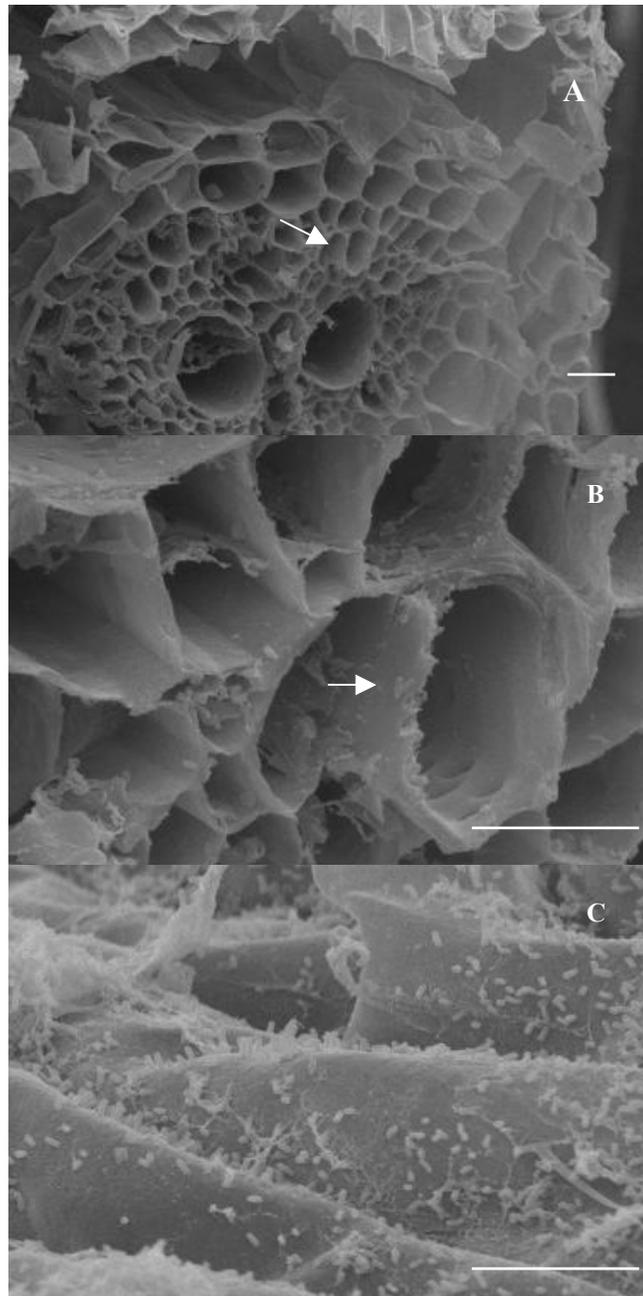


Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-12, *Zoogloea ramigera*. (A) Localização da colonização na raiz. 5090x. (B) Presença da bactéria nas células do córtex. 3000x. (C) Colonização da parte externa da raiz e intensa formação de muco. 3000x. As barras representam: (A) 20 μm , (B e C) 10 μm

Esse isolado, foi encontrado nos espaços intercelulares (Figura 7), assim como o IAC-HT-11, porém também foi observado dentro das células do parênquima nas raízes. Pode-se observar a presença de grânulos intracelulares de poli-hidroxibutirato nas células desse isolado, os quais já foram observados nesse gênero de bactéria (Saito et al., 1992), estando relacionado a substâncias de reserva comumente encontrado em procariontos.

(continua)

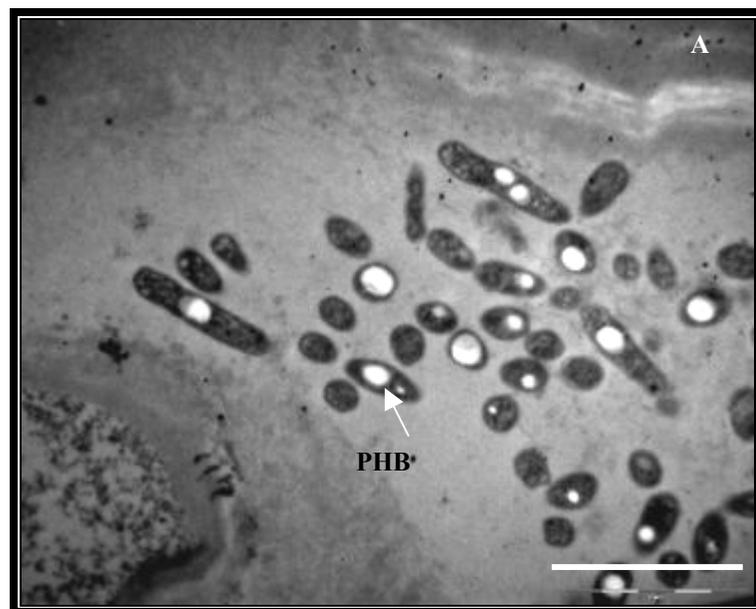


Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-12, *Zoogloea ramigera*. (A) Colonização intracelular da célula do córtex da raiz. (PHB) inclusões de poli-hidroxibutirato nas células bacterianas. (B) Presença da bactéria no espaço intercelular das células do córtex. As barras representam 2 µm

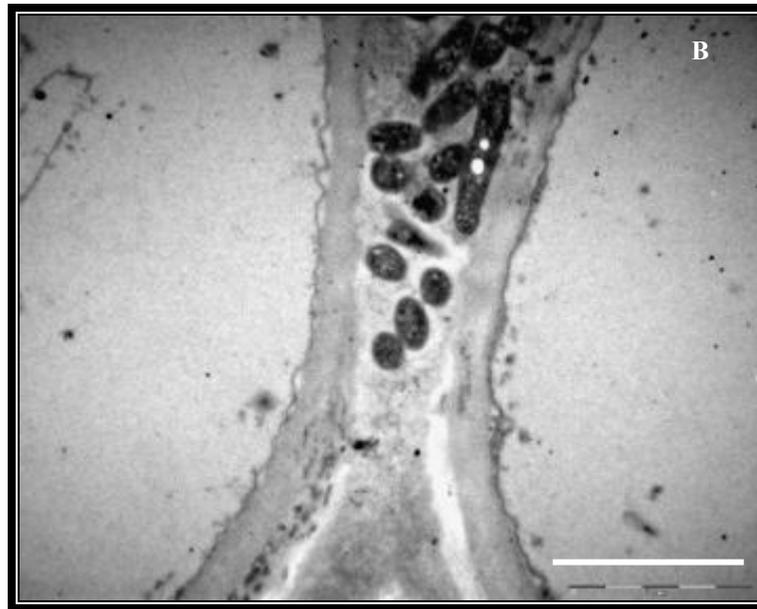


Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de raízes de trigo, região de alongamento, após 15 dias da inoculação do isolado IAC-HT-12, *Zoogloea ramigera*. (A) Colonização intracelular da célula do córtex da raiz. (PHB) inclusões de poli-hidroxibutirato nas células bacterianas. (B) Presença da bactéria no espaço intercelular das células do córtex. As barras representam 2 μm

Organismos do gênero *Zoogloea* são capazes de fixar N_2 e já foram isolados das raízes não desinfetadas superficialmente da gramínea *Leptochloa fusca* (BILAL; MALIK, 1987), e ainda, foi o grupo predominante encontrado em plantas de arroz (HASHIDOKO et al., 2002). Geralmente, exibem um crescimento característico devido a presença de uma cápsula extracelular, que em meio de cultura formam agregados em forma de estrelas como pequenos flocos. Porém alguns isolados, como o IAC-HT-12, não apresentam nitidamente essa característica, que pode ser influenciada pela composição do meio de cultivo, pH, temperatura, entre outros (ZHANG; LIN, 1999), dificultando sua identificação.

Os isolados IAC-HT-11 e IAC-HT-12 apresentaram crescimento característico de bactérias diazotróficas em meio semi-sólido sem nitrogênio (JNFb) com formação de película densa. Esses isolados demonstraram capacidade de fixação de N em cultura pura, pela análise da redução de acetileno (SALA et al., 2005).

Atualmente, está sendo demonstrado que algumas bactérias, já descritas anteriormente, são capazes de colonizar o interior das raízes de diversas culturas,

como por exemplo, *Bulkholderia vietnamiensis* encontrada em plantas de milho (CABALLERO-MELADO et al., 2001) e de cana-de-açúcar (GOVINDARAJAN et al., 2006). E ainda, novas espécies estão sendo descritas, como *Herbaspirillum hiltneri*, isolada de raízes de plantas de trigo (ROTHBALLER et al., 2006).

Embora a hibridização DNA/DNA seja considerada um método mais consistente na determinação de espécies, a similaridade de seqüências do DNA ribossomal 16S, para muitos grupos de microrganismos, pode ser considerada uma ferramenta com alto potencial para se determinar a posição filogenética de procariotos (STACKEBRAND; GOEBEL, 1994). Neste estudo, os resultados de similaridade dos isolados de plantas de trigo, IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12, foram acima de 97%, sendo portanto, um método consistente e de alta resolução na identificação dos isolados. Além disso, ressalta-se que esse é o primeiro relato do isolamento de bactérias pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Zoogloea* de raízes de plantas de trigo desinfetadas superficialmente.

2.3 Conclusões

- Bactérias dos gêneros *Achromobacter* e *Zoogloea* estão associadas às raízes de plantas de trigo, estando presentes no rizoplaneo assim como na parte interna das raízes, podendo ser consideradas bactérias endofíticas.

Referências

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford v.29, p.922-928, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.521-577, 2004.

BERTRAND, H.; PLASSARD, C.; PINOCHET, X.; TOURAINE, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.) **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.46, p.229-236, 2000.

BILAL, R.; MALIK, K. Isolation and identification of a N₂-fixing Zoogloea-forming bacterium from kallar grass histoplane. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.62, p.289-294, 1987.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA-de los SANTOS, P. *Bulkholderia unamae* sp., a N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.1165-1172, 2004.

COENYE, T.; VANCANNEYT, M.; FALSEN, E.; SWINGS, J.; VANDAMME, P. *Achromobacter insolitus* sp. Nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples. **International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.53, p.1819-1824, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, SPI.; Itaguaí: EMBRAPA, CNPAB, 1995. 60p.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microrganism and nitrogen- fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1., Washington, 1976. **Proceedings...**Washington: Washington State University, 1976. p.518-538.

ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHOF, G.; HABRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineri* sp. nov., a nitrgen-fixing bacterium associated with the C₄-grass Miscanthus. **International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.17-26, 2001.

FANI, R., BADI, C., BAZZICALUPO, M., CECCHERINI, M.T., FANCELLI, S., GALLORI, E., GERAE, L. GRIFONI, A., MICLAUS, N. DAMIANI, G. Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.129, p.195-200, 1995.

GENBANK-NCBI-NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.gov>>. Acesso em: 01 fev. 2006.

GERK, L.P.; GILCHRIST, K.; KENNEDY, I.R. Mutants with enhance nitrogenase activity in hidoponic *Azospirillum brasilense*-wheat associations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.2175-2184, 2000.

GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. **Biology and Fertility of Soil**, Oxford, v.33, p.410-415, 2001.

GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D; FREITAS, J.R.; SEIB, A.M. Diversity of root-associated bacteria with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.26, p.43-50, 1998.

GOERTZ, R.D.; PENGRA, R.M. Physiology of nitrogen fixation by a species of *Achromobacter*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.81, p.568-572, 1960.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; GOPALAKRISHNAN, R.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Bulkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.280, p.239-252, 2006.

HASHIDOKO, Y.; TADA, M.; TAHARA, S. Soft gel medium solidified with gellan gum for preliminary screening for root-associating, free-living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizoplane of plants. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v.66, p.2259-2263, 2002.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Irvine: University of California, 1950. 347p.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular plant-microbe interations**, St Paul, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

ITZIGSOHN, H.: Sitzungs-Berichte der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin, p. 30-31, 1968.

KHAMMAS, K.M.; AGERON, G.; GRIMONT, P.A.; KEISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacteria associated with rice and rhizosphera soil. **Research Microbiology**, Amsterdam, v.140, p.679-693, 1989.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York v.16, p.111-120, 1980.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura. Piracicaba: NAP/MEPA, 1997. 46p. (Apostila do 25º curso de microscopia eletrônica de varredura).

KUMAR. S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. **Bioinformatics**, Oxford, v.17, p.1244-1245, 2001

LENANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B.; KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immuno-gold labeling. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.117, p.207-218, 1989.

LIU, Y.; CHEN, S.; LI, J. Colonization Pattern of *Azospirillum brasilense* Yu62 on maize roots. **Acta Botânica Sinense**, Beijing, v.45, p.748-752, 2003.

LYNCH, J.M.; WHIPPS, J. M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.129, p.1-10, 1990.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DOBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v.55, p.417-430, 1983.

MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; LILBURN, T.G.; PARKER, C.T. JR.; SAXMAN, P.R.; FARRIS, R.J.; GARRITY, G.M.; OLSEN, G.J.; SCHMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M. The RDP-II (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, London, v.29, p.173-174, 2001.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Oxford, v.42, p.565-572, 2004a.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, Philadelphia, v.166, p.525-530, 2004b.

MOHN, W.W.; WILSON, A.E.; BICHO, P.; MOORE, E.R. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.22, p.68-78, 1999.

NORBERG, A.B.; ENFORS, S. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.1231-1237, 1982.

PESARO, M.; WIDMER, F. Identification and specific detection of a novel Pseudomonadaceae cluster associated with soils from winter wheat plots of a long-term agricultural field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, p37-43, 2006.

PITCHER, D.G., SAUNDERS, N.A., AND OWENS, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v.8:, p.151-156, 1989.

RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p. 987-994,2004.

REINHOULD, B.; HURCK, T.; FENDRICK, I.; GILLIS, M.; DELEY, J. *Azospirillum halopraeferans* nov. a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grasses. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Reading, v.37, p.43-51, 1987.

REINHOULD, B.; HURCK, T. Live in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends of Microbiology**, Cambridge, v.6, p.139-144, 1998.

Ribosomal Database Project - RDP, Wisconsin, USA. Disponível em : <<http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>> Acesso em: 01 fev. 2006.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Reading, v.56, p.1341-1348, 2006.

SAITO, T.; SAEGUSA, H.; MYYATA, Y.; FUKIU, T. Intracellular degradation of poly(3-hydroxybutyrate) granules of *Zoogloea ramigera* I-16-M. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.103, p.333-338, 1992.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.4, p.406-425, 1987.

SALA, V.M.R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 123p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p. 345-352, 2005.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note : A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Reading, v.44, p.846-849, 1994.

STEENHOUDT, O.; VADERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, p.487-506, 2000.

THOMPSON, J.D. HIGGINS, D.G. GIBSON, T.J. CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v.22, p.4673-4680, 1994.

XIE, C.; YOKOTA, A. *Zoogloea oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from rice paddy soil, and reclassification of the strain ATCC 19623 as *Crabtreeella saccharophila* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p.619-624, 2006.

ZHANG, T; LIN, Z. Microbial flocculant and its application in environmental protection. **Journal of Environmental Sciences**, Shanghai, v.1, p. 1-12

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.2198-2208, 2002.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; BRUIJN, F.D.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p.99-114, 1997.

YABUUCHI, E.; YANO, I. *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v.31, p.477-478, 1981.

YABUUCHI, E.; KAWAMURA, Y.; KOSAKO, Y.; EZAKI, T. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *Denitrificans* (Rüger and Tan) comb. nov. **Microbiology Immunology**, Tokio, v.42, p.429-438, 1998.

3. RESPOSTA DE GENÓTIPOS DE TRIGO À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CONDIÇÕES DE CAMPO.

Resumo

Com o objetivo de estudar os possíveis benefícios propiciados por isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas à cultura do trigo em condições de campo, foram instalados dois experimentos no Estado de São Paulo. O delineamento experimental utilizado foi de parcelas sub-subdivididas, sendo: na parcela três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*); na sub-parcela dois genótipos de trigo (ITD-19 e IAC-370), e na sub-sub-parcela três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha⁻¹). O inoculante utilizado foi na forma de turfa em pó. No estágio de quatro folhas e no perfilhamento foram avaliados a massa de matéria seca e o N acumulado na parte aérea. Na colheita foram avaliados o teor de N, a massa de mil sementes e a produtividade de grãos. A inoculação promoveu maior massa de matéria seca e N acumulado e aumentou a produtividade de grãos, principalmente na presença de adubo nitrogenado adicional, porém, revertendo em lucro para o agricultor. Entretanto, o maior aumento na produtividade de grãos foi obtido nas plantas do genótipo IAC370 com o emprego do isolado IAC-HT-12 na ausência de N adicionado, superando em 45% o tratamento testemunha. As respostas variaram em relação ao local de cultivo, sugerindo uma expressiva interação planta-bactéria-ambiente, que interfere no crescimento e produtividade da planta.

Termos para indexação: *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, Adubação nitrogenada, Produtividade de grãos.

Abstract

Two field experiments were carried out in São Paulo State with the aim of evaluating the benefits from inoculation of endophytic diazotrophic bacteria in wheat plants. The experimental set up consisted of a split-split-plot design, with three strains of diazotrophic bacteria (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*); two wheat genotypes (ITD-19 and IAC-370), three levels of nitrogen fertilizer as urea (0, 60 e 120 kg ha⁻¹). The carrier of the inoculants was powdered peat. Shoot dry matter and total shoot nitrogen were evaluated at four leaves and at tillering stage. Grain N concentration, yield and 1000 grains weight were evaluated at harvest. Inoculated plants presented increases in dry matter, N accumulation and grain yield, especially in combination with N fertilizer, generating financial profits for the farmer. However, the genotype IAC370 showed the highest increase in grain yield with the strain IAC-HT-12 in the absence of added N, exceeding the uninoculated control by 45%. The responses to inoculation varied according to the location, suggesting a complex interaction of plant, bacteria and the environment, that modulates wheat growth and yield.

Index terms: *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, N fertilizer, Grain yield.

3.1 Introdução

O trigo é a segunda cultura de grãos em produção ao nível mundial. As maiores produtividades são obtidas nos países da União Européia, porém a produtividade média está apenas um pouco acima do Brasil. A intensificação das pesquisas vem gerando grandes avanços na produtividade do trigo.

O nitrogênio constitui o macroelemento mais limitante na produtividade do trigo, pois determina o número de afilhos ou perfilhos, sendo essencial na fase de formação dos nós, no início do alongamento. É estimado que as plantas conseguem utilizar apenas 50% do fertilizante nitrogenado aplicado como adubo, sendo que metade é perdida via lixiviação e desnitrificação (DOBBELAERE et al., 2002).

Somente as culturas do trigo, milho e arroz consomem aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados utilizados no mundo (LADHA et al., 2005). Portanto, devido à extensa área ocupada pelos cereais, aproximadamente 5 vezes a das leguminosas, a fixação biológica (FBN) associada a essas culturas torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte de suas necessidades de nitrogênio possa ser suprida pela FBN.

Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas, pois parece haver alguma especificidade na compatibilidade entre a bactéria e a planta hospedeira. Além disso, existe um consenso geral de que o genótipo da planta é o fator chave para obtenção dos benefícios oriundos da fixação biológica do N₂, conjuntamente com a seleção de estirpes eficientes (REIS et al., 2000).

De acordo com Bashand e Levanony (1990), aumentos moderados, em torno de 20%, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, seriam considerados comercialmente significativos na agricultura moderna, desde que consistentes. Em artigo de revisão sobre 20 anos de inoculação de *Azospirillum* em experimentos de campo, os autores recomendam a implantação de um inoculante comercial, concluindo que é possível promover o aumento da produtividade em importantes culturas agrícolas, em diferentes solos e em diferentes regiões climáticas. O sucesso da inoculação foi obtido em 60-70% dos experimentos já realizados (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda se observam respostas muito variáveis, ou seja, falta de reprodutibilidade dos resultados, o que tem limitado a produção de um inoculante comercial (DOBBELAERE et al., 2002).

Assim sendo, é de grande importância a intensificação de experimentos de campo, visando o desenvolvimento de práticas agrícolas para uma agricultura mais sustentável, entre elas a substituição parcial do adubo nitrogenado por bactérias diazotróficas. O objetivo desse trabalho foi avaliar, em condições de campo, o efeito da inoculação de isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas em dois genótipos de trigo em duas localidades.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

Os experimentos de campo foram instalados em 2002 no Centro Experimental Central do Instituto Agrônômico de Campinas/APTA, em latossolo vermelho eutrófico típico e na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Mococa pertencente ao Polo Regional D.T.A Nordeste Paulista, em argissolo vermelho eutrófico típico, ambos com irrigação por aspersão.

As adubações de P, K e micronutrientes foram feitas baseadas na tabela de recomendação de adubação para a cultura do trigo irrigado para o Estado de São Paulo (RAIJ et al., 1997), conforme as análises de solo dos experimentos (profundidade 0-20 cm). Características químicas do solo em Campinas: MO 32 g dm³, pH em CaCl₂ 5,4, P 32 mg dm³, Ca 22, Mg 9, H+Al 28, S.B. 32, C.T.C 62 mmolc dm³, V% 52, B 0,2, Cu 6, Fe 1, Mn 31,2 e Zn 1,6 mg dm³. Em Mococa: MO 28 g dm³, pH em CaCl₂ 5,2, P 56 mg dm³, Ca 36, Mg 14, H+Al 28, S.B. 55,3, C.T.C 83 mmolc dm³, V% 62, B 0,18, Cu 6, Fe 19, Mn 18,2 e Zn 2,5 mg dm³.

O delineamento experimental utilizado foi de parcelas sub-subdivididas (1,2 X 24,0m = 28,8m²), com quatro repetições, sendo: na parcela três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12); na sub-parcela dois genótipos de trigo (ITD-19, *Triticum durum* L. e IAC-370, *Triticum aestivum hard* L.), e na sub-sub-parcela três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha⁻¹). O genótipo ITD-19 é considerado um material ineficiente e responsivo quanto ao uso do adubo nitrogenado, ou seja, é ineficiente porque, na ausência de fertilizante nitrogenado, apresenta menor produção de grãos que a média da população, e responsivo quando aplicado N ao solo, pois apresenta aumento da produção de grãos em função do N adicionado. Já o genótipo IAC-370 é considerado eficiente e responsivo.

Para o preparo dos inoculantes os isolados foram repicados em meio de cultura líquido acrescido de nitrogênio, sendo esses: NFb (IAC-AT-8) e JNFb (11 e IAC-HT-12). As culturas cresceram sob agitação constante durante 24 horas. Foi utilizada turfa em pó como carreador, contendo 10⁹ células g⁻¹ de turfa, e misturado na semente no

momento do plantio; foram utilizados 6,5g de inóculo para 80g de sementes. O plantio foi realizado mecanicamente.

Os isolados utilizados: IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense* (acesso no Genbank nº DQ386149), isolado em meio NFb, idealizado para o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus* (acesso no Genbank nº DQ386150) e IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera* (acesso no Genbank nº DQ389143), isolados em meio JNFb, idealizado para o isolamento de *Herbaspirillum*, foram obtidos de raízes desinfestadas superficialmente do genótipo de trigo ITD19, ou seja, são estirpes homólogas (SALA et al., 2005). Esses isolados foram selecionados devido ao seu desempenho positivo em experimento em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005) e em casa de vegetação com substrato esterilizado (SALA, 2002).

No estádio de quatro folhas e no perfilhamento foram colhidos em cada parcela experimental 50cm lineares de planta, de uma das linhas centrais, coletando-se a parte aérea das plantas. A massa de matéria seca foi obtida após secagem das plantas em estufa a 60°C com circulação de ar. Posteriormente, procedeu-se à moagem e homogeneização para determinação da concentração de N pelo método micro-Kjeldahl (BREMNER, 1965). Por ocasião da colheita foram avaliadas a concentração de N nas sementes, a produtividade de grãos e a massa de mil sementes.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa Sanest, fazendo-se análise da variância seguida da comparação das médias pelo teste de Duncan a 5%. Para comparação entre doses de nitrogênio foram feitas regressões polinomiais.

3.2.2 Resultados e Discussão

3.2.2.1 Produção de biomassa e acúmulo de nitrogênio

3.2.2.1.1 Experimento –Campinas

No experimento realizado em Campinas, as plantas do genótipo IAC370, no estádio de quatro folhas, na presença do isolado IAC-AT-8 apresentaram maior massa

de matéria seca e quantidade acumulada de N na parte aérea na dose de 60 kg ha⁻¹ de N (Tabela 1).

Tabela 1 - Massa de matéria seca da parte aérea e N acumulado de dois genótipos de trigo, no estágio de quatro folhas, do experimento de campo instalado em Campinas, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação

Tratamentos		Doses de N, kg ha ⁻¹					
		0	60	120	0	60	120
		Massa de matéria seca, g m linear ⁻¹			N acumulado, g m linear ⁻¹		
Estádio 4 folhas							
IAC-370	IACAT8	9,53A	12,13A	9,60A	0,446A	0,563A	0,480A
	IACHT11	9,40A	10,46A	7,93A	0,380A	0,455AB	0,374A
	IACHT12	7,66A	6,65B	10,40A	0,370A	0,334B	0,520A
	TEST	10,50A	8,66AB	10,25A	0,495A	0,420AB	0,514A
ITD-19	IACAT8	8,53B	9,86B	16,80A*	0,340BC	0,421B	0,815A*
	IACHT11	9,33B	9,80B	8,45B	0,464AB	0,521AB	0,450B
	IACHT12	12,86A*	15,13A*	10,46B	0,538A	0,691A*	0,476B
	TEST	7,00B	8,13B	11,65B	0,274C	0,394B	0,585B

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical, dentro de cada genótipo, e asteriscos são para comparação entre genótipos dentro do mesmo tratamento

No estágio de perfilhamento, quando a adubação de cobertura já havia sido realizada, estando completa a dose de N utilizada, todos os isolados empregados promoveram aumento significativo da biomassa e houve uma tendência de aumento no N acumulado com esta mesma dose de N em relação ao tratamento testemunha (Figuras 8A e 8B- Tabela 1 do anexo). Nesse estágio, observou-se um ajuste quadrático da biomassa em relação às doses de N adicionadas nas plantas que

receberam inóculo. Entretanto, somente se observou a mesma tendência no acúmulo de N na presença do isolado IAC-HT-12.

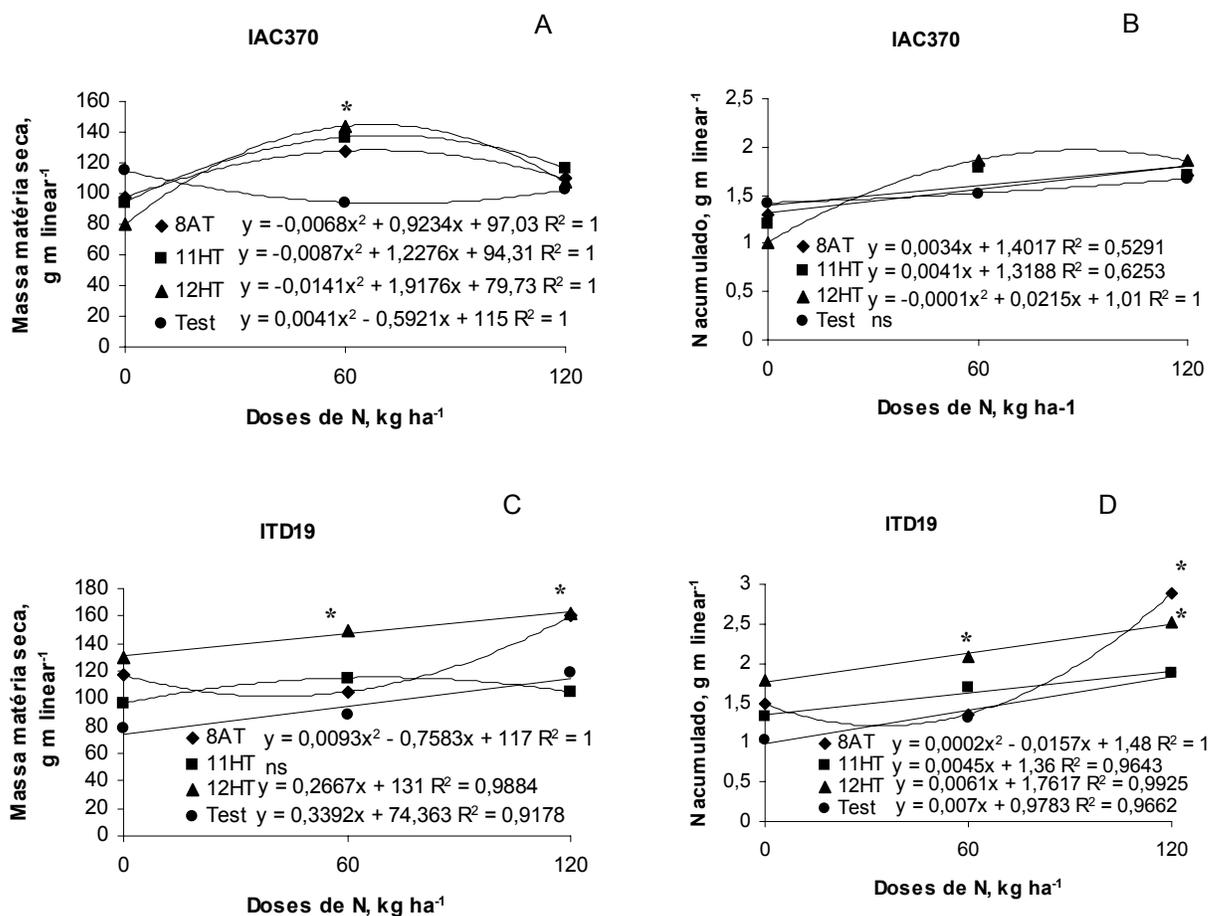


Figura 8 - Massa de matéria seca da parte aérea e N acumulado no estágio de perfilhamento no genótipo IAC370 (A e B) e ITD19 (B e C) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (♦), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●) em Campinas-SP. Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5% isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N

As plantas do genótipo ITD19, na presença do isolado IAC-HT-12, apresentaram aumento significativo da massa de matéria seca e N acumulado, nas doses 0 e 60 kg ha⁻¹ de N em ambos os estádios avaliados, sendo mais beneficiadas com a inoculação desse isolado em relação às plantas do genótipo IAC370 (Tabela 1 e Figuras 8C e 8D- Tabela 1 do anexo). No estágio de perfilhamento, houve um ajuste

linear em relação às doses de N adicionadas, na presença do isolado IAC-HT-12 (Figuras 8C e 8D- Tabela1 do anexo). A adição de uma alta dose de N causou uma interação positiva do genótipo ITD19 com os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-12, o que reverteu em aumento no crescimento e acúmulo de N.

3.2.2.1.2 Experimento –Mococa

No experimento realizado em Mococa, na avaliação da massa da matéria seca e do N acumulado na parte aérea das plantas de trigo, no estágio de quatro folhas, não houve diferenças significativas entre os isolados utilizados e a testemunha.

Entretanto, no estágio de perfilhamento, as plantas do genótipo IAC370, foram beneficiadas pela inoculação do isolado IAC-HT-12 quando se adicionou nitrogênio, apresentando maior massa de matéria seca, nas doses de 60 e 120 kg ha⁻¹ de N, e aumento do N acumulado, na dose de 120 kg ha⁻¹ de N, em relação ao tratamento testemunha. Em relação às doses de N empregadas, houve um ajuste quadrático para todos os tratamentos utilizados, com um pico de produção de biomassa, em média na dose de 100 kg ha⁻¹, entretanto, para N acumulado o ajuste foi linear (Figuras 9A e 9B- Tabela 2 do anexo).

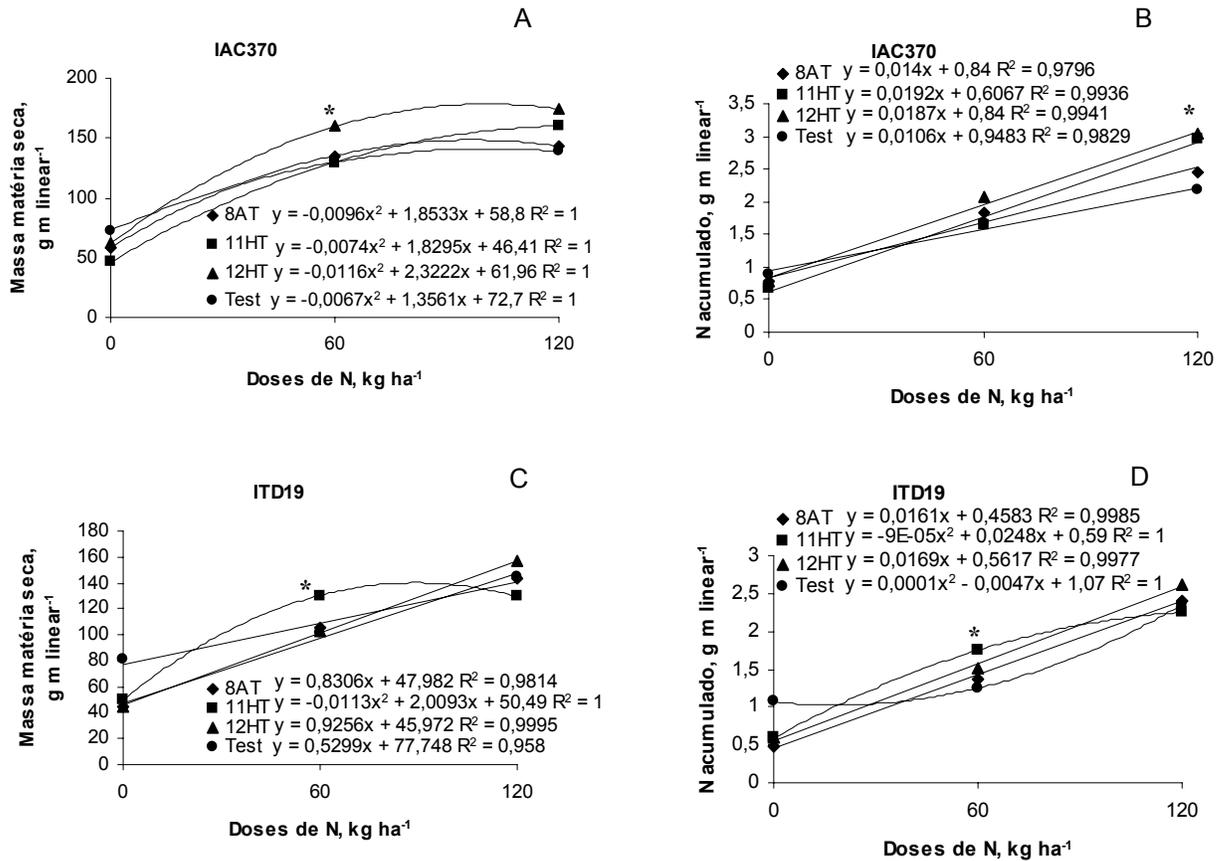


Figura 9 - Massa de matéria seca da parte aérea e N acumulado no estágio de Perfilhamento nos genótipos IAC-370 (A e B) e ITD19 (B e C) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (♦), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●), em Mococa-SP. Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5% isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N

No genótipo ITD19, na ausência de N adicionado, as plantas que não receberam inóculo apresentaram maior massa de matéria seca e N acumulado que os tratamentos com inóculo, demonstrando uma influência negativa da inoculação (Figuras 9B e 9C-Tabela 2 do anexo). Já foi observado que, na ausência de adubo nitrogenado, a inoculação pode causar um decréscimo na massa de matéria seca da parte aérea em relação à testemunha (DIDONET et al., 2000). O mesmo autor atribuiu esse efeito a um possível aumento no crescimento das raízes em relação à parte aérea e, também, já foi demonstrado que os isolados utilizados neste experimento aumentaram o crescimento

das raízes em condições gnotobióticas (SALA et al.,2005). Outra hipótese seria atribuir esse efeito ao fato de que bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas não contribuem com quantidades suficientes de N fixado para garantir produtividade máxima, sendo que a ausência de N pode representar um alto custo da associação para a planta em uma condição de baixo nível de N no solo.

Quando se adicionaram 60 kg ha⁻¹ de N, nas plantas do genótipo ITD19, o isolado IAC-HT-11 propiciou aumento da massa de matéria seca e N acumulado, observando-se um ajuste quadrático em relação às doses de N adicionadas na presença do mesmo isolado (Figuras 9C e 9D- Tabela 2 do anexo).

3.2.2.2 Produtividade de grãos

3.2.2.2.1 Experimento –Campinas

Em Campinas, as plantas do genótipo IAC370 apresentaram aumento significativo da produção na presença do isolado IAC-HT-12, nas doses 0 e 120 kg ha⁻¹ de N, promovendo aumentos de aproximadamente 1000 kg ha⁻¹ em ambas as situações, o que representa um incremento de 45% e 27% respectivamente, em relação à testemunha (Figura 10A- Tabela 3 do anexo). Porém, nesse genótipo não se tinha constatado efeito benéfico da inoculação sobre a biomassa na presença desse isolado (Figura 8A- Tabela 1 do anexo). Entretanto, pode ter havido um maior crescimento das raízes em relação à parte aérea, o que pode ter propiciado o aumento na produtividade, ou ainda, menor investimento em biomassa em benefício do grão.

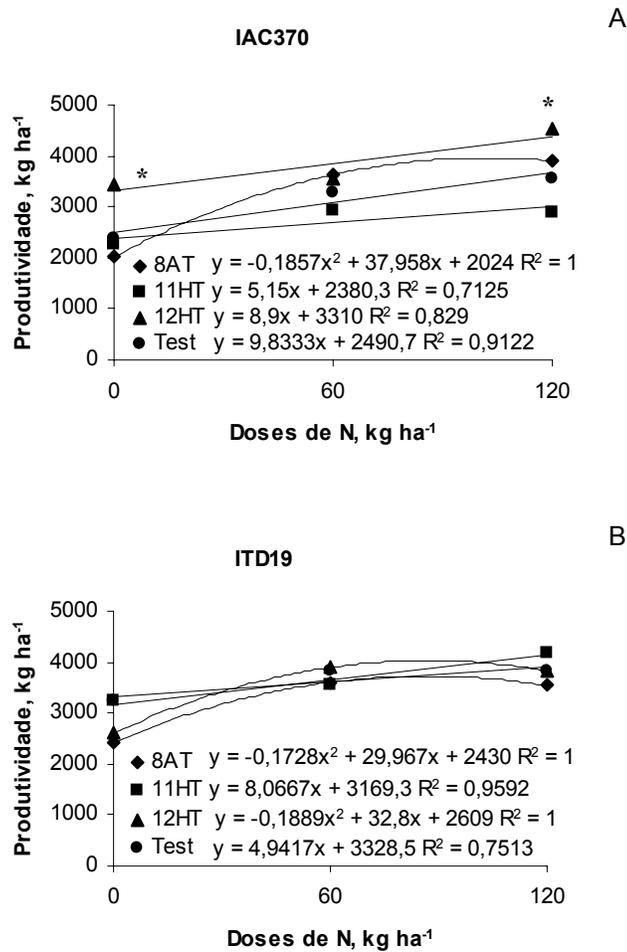


Figura 10 - Produtividade do genótipo IAC370 (A) e ITD-19 (B) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●), em Campinas-SP. Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5% isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N

No genótipo IAC370, na presença do isolado IAC-HT-12, a produtividade na ausência de N foi praticamente igual com 60 kg ha⁻¹ de N, demonstrando um potencial de utilização desse isolado para economia do N aplicado. Também, na presença do isolado IAC-HT-12, observou-se que as quantidades de nitrogênio empregadas não foram um fator limitante para obtenção de benefícios propiciados por este isolado (Figura 10A- Tabela 3 do anexo).

Nas plantas da cultivar ITD19, na dose de 120 kg ha⁻¹ de N, houve uma

tendência de aumento de aproximadamente 400 kg na produtividade na presença do isolado IAC-HT-11, ganho de 10% em relação ao tratamento testemunha. Também, esse isolado promoveu uma maior produtividade do genótipo ITD19 quando comparado ao genótipo IAC370 em todas as doses de N empregadas (Figura 10B- Tabela 3 do anexo).

Independente da dose ou cultivar utilizado, a massa de mil grãos foi influenciada pelo emprego dos isolados testados (Figura 11), sendo que, as sementes das plantas com a inoculação apresentaram maior massa que as da testemunha, o que pode ter sido devido a uma melhor distribuição do N na planta, demonstrando novamente o melhor aproveitamento da biomassa gerada em benefício da produção de grãos. O teor de nitrogênio no grão não foi influenciado pelos isolados utilizados, porém, o isolado IAC-HT-12 promoveu maior quantidade acumulada de N (dado não apresentado).

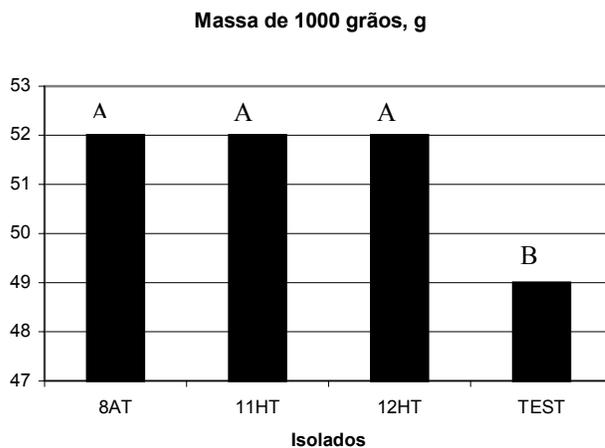


Figura 11 - Massa de mil grãos sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação, em Campinas-SP. Letras iguais não diferem pelo teste de Duncan a 5%

3.2.2.2.2 Experimento –Mococa

Na análise da produtividade no experimento realizado em Mococa, no genótipo IAC370 (Figura 12A- Tabela 4 do anexo), somente houve efeito benéfico da inoculação quando se adicionaram 120 kg ha⁻¹ de N, sendo que os tratamentos com os isolados

IAC-AT-8 e IAC-HT-11 foram superiores à testemunha, promovendo um aumento na produtividade de 20% e 26% respectivamente.

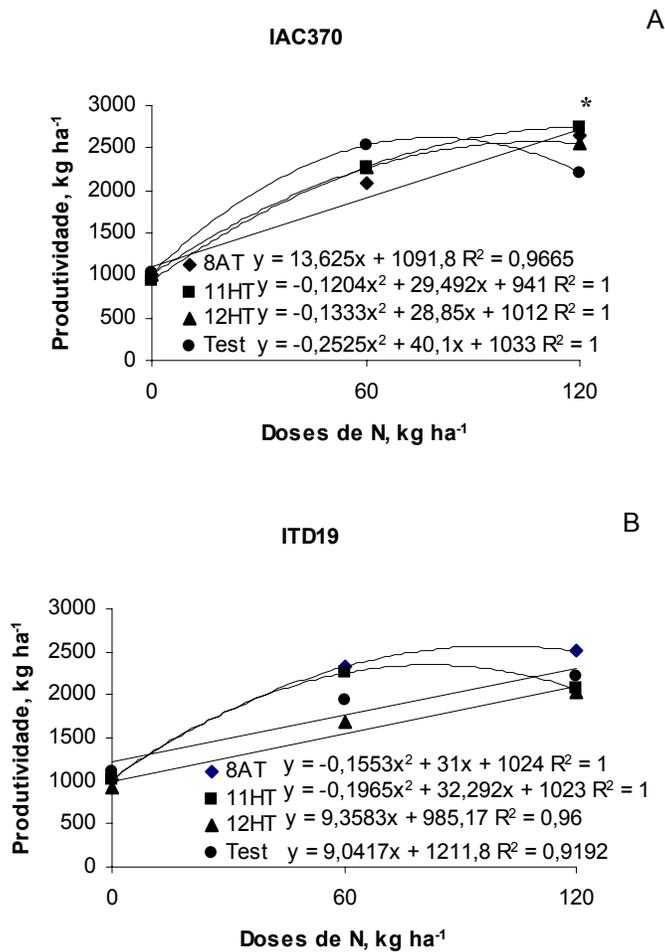


Figura 12 - Produtividade dos genótipos IAC370 (A) e ITD19 (B) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (♦), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●), em Mococa-SP. Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5% isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N

No genótipo IAC370, o emprego do isolado IAC-HT-12 não propiciou uma maior produtividade em relação ao tratamento testemunha, entretanto, na presença de adubo nitrogenado, esse genótipo foi mais beneficiado por esse isolado que o genótipo ITD-19. Observou-se uma regressão linear em relação às doses empregadas na presença do isolado IAC-AT-8, enquanto os demais tratamentos tiveram um ajuste quadrático,

com ponto de máxima em torno de 100 kg ha^{-1} de N (Figura 12A- Tabela 4 do anexo).

No genótipo ITD19, assim como no IAC370, na ausência de fertilizante nitrogenado não houve efeito benéfico da inoculação para a produtividade de grãos. Porém, quando se adicionou N, na presença dos isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-11, na dose de 60 kg ha^{-1} de N, observou-se que houve uma tendência de aumento da produtividade de aproximadamente 20%, e também com a adição 120 kg ha^{-1} de N e o isolado IAC-AT-8, houve aumento de 14% em relação à testemunha (Figura 12B- Tabela 4 do anexo).

No experimento realizado em Mococa, somente obteve-se um aumento significativo na produtividade devido à inoculação, no genótipo IAC370 com a adição de $120 \text{ kg de N ha}^{-1}$, indicando que altos níveis de fertilizante nitrogenado não foram um fator limitante para os benefícios propiciados por bactérias diazotróficas endofíticas.

A massa de matéria seca e o acúmulo de N na parte aérea, assim como a produtividade de grãos não foram beneficiadas pela inoculação, no tratamento sem adubação nitrogenada nesse experimento realizado em Mococa. Provavelmente, a associação planta-bactéria representou um alto custo para a planta, não proporcionando benefícios nessa condição.

Apesar da baixa produtividade obtida no experimento instalado em Mococa, o que se deve provavelmente a uma irrigação deficiente, foi possível verificar benefícios provenientes da inoculação, obtendo-se aumentos de até 26% na produtividade, na maior dose de N utilizada. No Rio Grande do Sul, têm sido obtidos aumentos de no máximo 20% em relação ao tratamento testemunha (DIDONET et al., 1996), sendo que, segundo Bashand e Levanony (1990), um aumento de 20% já pode ser considerado comercialmente significativo, desde que consistente.

O teor de N nas sementes, da mesma forma que no experimento realizado em Campinas, e a massa de mil sementes não foram influenciadas pelo emprego dos isolados utilizados, o que pode indicar que a produtividade foi determinada pela quantidade de grãos e não pela massa dos mesmos.

3.2.2.2 Considerações Gerais

Um dos pontos cruciais para seleção e manejo desses diazotróficos é a especificidade planta-bactéria, conforme revisado por Baldani e Baldani (2005). No presente trabalho foi observado que apesar desses isolados terem sido obtidos das raízes desinfestadas superficialmente do genótipo ITD19 (SALA et al., 2005), somente no genótipo IAC370 foi obtido aumento significativo da produtividade com a inoculação em relação ao tratamento testemunha e esse efeito se repetiu nas duas localidades estudadas.

Esse genótipo foi beneficiado pela inoculação, mesmo em altos níveis de fertilizante nitrogenado, possivelmente, porque é altamente responsivo à adição de N e apresenta um alto rendimento de grãos em condições favoráveis, segundo o artigo Trigo IAC-370 armageddon (1999). Ainda, pode ter ocorrido uma seleção natural e/ou uma adaptação na associação planta-bactéria diazotrófica, uma vez que os isolados utilizados foram obtidos de plantas de trigo na presença de adubação nitrogenada (SALA et al., 2005). Uma hipótese seria que esses isolados adquiriram a característica de manter o nível da FBN mesmo na presença de altos níveis de N.

Existem muitos relatos dos benefícios propiciados pela inoculação em plantas de trigo com a adição de fertilizante nitrogenado (DIDONET et al., 1996; 2000), inclusive de Dalla Santa et al. (2004), que obtiveram aumento da produtividade de trigo com a inoculação de uma estirpe de *Azospirillum*, em experimento de campo, nos tratamentos com 100% do nitrogênio recomendado.

As evidências sugerem que em plantas de trigo a inoculação não substitui o adubo nitrogenado, porém, promove a melhor absorção e utilização do N disponível (SAUBIDET et al., 2002). Já foi observado que os isolados utilizados promovem aumento no crescimento das raízes de plantas de trigo em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005), sendo que o efeito estimulatório no desenvolvimento das raízes, nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta, pode ser responsável pelo efeito positivo da inoculação (MERTENS; HESS, 1984). A maior absorção de N pelas raízes pode ser devido à produção pela bactéria de auxinas, citoquininas e giberelinas

(BALDANI; BALDANI, 2005), e ainda, ao aumento no número de raízes e pêlos radiculares (DOBBELAIRE et al., 1999), o que permite uma melhor exploração do solo, podendo também, promover benefícios em condições de estresse hídrico em trigo (CREUS et al., 2004), efeito que provavelmente ocorreu no experimento realizado em Mococa.

A inoculação pode ser considerada uma prática pouco onerosa para a cultura do trigo, uma vez que, baseando-se no preço do inoculante na forma de turfa, utilizado para a cultura da soja, o valor gasto com a inoculação seria de R\$5,40 ha⁻¹ (LOPES¹, comunicação pessoal). Considerando o preço do trigo de R\$350,00 a tonelada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB), aumentos acima de 15,43 kg ha⁻¹ de grãos já justificariam a prática da inoculação.

Sabendo-se que o preço médio da tonelada da uréia é de R\$980,00 (preço médio praticado no mercado de Campinas-SP) e do trigo R\$350,00, a dose que proporcionaria maior retorno econômico por unidade de área no experimento realizado em Campinas para o genótipo IAC370 seria de 120 kg ha⁻¹, para o tratamento com o isolado IAC-HT-12 e o tratamento testemunha, uma vez que as respostas à adição de N foram lineares, e os coeficientes lineares das equações ajustadas (Figura 10A- Tabela 3 do anexo) são maiores que a relação de preços entre a tonelada de trigo e da uréia (6,08). Considerando o custo do inóculo de R\$5,40 ha⁻¹, o lucro obtido seria de R\$328,00 ha⁻¹ com o emprego do isolado IAC-HT-12, em relação ao tratamento testemunha.

No genótipo ITD19, com o emprego do isolado IAC-HT-11, a dose que proporcionaria a máxima produtividade econômica também seria de 120 kg ha⁻¹ de N, e de 0 kg ha⁻¹ de N para o tratamento testemunha, sendo que, o lucro obtido com a inoculação seria de R\$77,00 ha⁻¹. Porém, comparando esses tratamentos na dose de 120 kg ha⁻¹ de N, o lucro aumentaria para R\$125,00 ha⁻¹.

Já no experimento realizado em Mococa, calculando-se a produtividade máxima econômica, para o genótipo IAC370 a recomendação de adubação nitrogenada seria de 120 kg ha⁻¹ de N para o isolado IAC-AT-8, de 97 kg ha⁻¹ para o isolado IAC-HT-11 e de 67 kg ha⁻¹ para o tratamento testemunha, sendo que a produtividade obtida com a inoculação nas doses acima mencionadas não propiciariam lucro em relação ao

¹LOPES, E.S. Bio Soja. São Joaquim da Barra-SP. <<http://www.biosoja.com.br>>

tratamento testemunha. Entretanto, considerando somente a produtividade obtida na maior dose de N utilizada (120 kg ha^{-1} de N), seriam obtidos lucros de R\$145,00 ha^{-1} com o isolado IAC-AT-8 e de R\$182,00 ha^{-1} com o isolado IAC-HT-11, sendo que, as plantas na presença do isolado IAC-AT-8 produziram 4 kg de grãos acima da testemunha por quilo de N adicionado, e do isolado IAC-HT-11, 5 kg acima da testemunha, demonstrando uma maior eficiência de utilização do N na maior dose utilizada.

Para o genótipo ITD19, a produtividade máxima econômica seria obtida na dose de 80 kg ha^{-1} de N com o emprego do isolado IAC-AT-8, de 67 kg ha^{-1} com o isolado IAC-HT-11 e de 120 kg ha^{-1} na testemunha, propiciando um lucro de R\$187,00 e de R\$143,00 ha^{-1} , respectivamente.

Este é o primeiro trabalho realizado em condições de campo com esses isolados, sendo que os resultados, ainda que preliminares, mostram que são potencialmente benéficos para essa cultura, revertendo em lucro para o agricultor. Porém, muita informação ainda é necessária para explicar o sucesso ou insucesso da inoculação, que pode ser atribuída a fatores ambientais, tipo de solo, exploração agrícola, isolado bacteriano, espécie vegetal, e ainda ao genótipo da planta e à microbiota nativa. Os experimentos de campo precisam ser repetidos várias vezes devido à falta de reprodutibilidade, que ocorre mesmo em condições mais controladas, como em casa de vegetação (MILLET; FELDMAN, 1985). Muitas vezes os resultados obtidos nessas condições não são observados no campo, pois há uma expressiva interação planta-bactéria-ambiente, que interfere no crescimento e produtividade da planta, como constatado no presente trabalho.

3.3 Conclusões

- ✓ Não houve especificidade genótipo-bactéria, uma vez que o genótipo IAC370 foi beneficiado pela inoculação em ambas as localidades estudadas e os isolados utilizados foram obtidos do genótipo ITD19.

- ✓ O local de cultivo influenciou as respostas obtidas com a inoculação.

- ✓ O maior incremento na produtividade de grãos foi obtido na ausência de N adicional, entretanto, aumentos menores, porém economicamente viáveis, foram obtidos na maior dose de N utilizada nas duas localidades estudadas.
- ✓ A inoculação proporcionou maior rentabilidade à cultura do trigo, mesmo com o emprego da maior dose de N utilizada.

Referências

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.77, p.549-579, 2005.
- BASHAND, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, p.591-605, 1990.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.) **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1149-1178.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Disponível em: http://www.conab.gov.br/download/comercializacao/precos_com/precos_2006/COMU_406.doc. Acesso em: 04 ago. de 2006.
- CREUS, C.M.; SUELDO, R.J.; BARASSI, C.A. Water relations yield in azospirillum-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Review Canadian Journal of Botanic**, Ottawa, v. 2, n 82, p.273-281, 2004.
- DALLA SANTA, O R., HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, p. 843-850, 2004.
- DIDONET, D.A.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa de matéria seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.9, p.645-651, 1996.
- DIDONET, D.A.; LIMA, O .S.; CANDATEN, M.H. RODRIGUES, O. realocação de de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.2, p.401-411, 2000.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v.36, p.284-297, 2002.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V., VANDERLEYDEN. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.212, p.155-164, 1999.
- LADHA, J.K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T. J.; SIX, J. ; KESSEL, C.V. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospect and prospects. **Advances in Agronomy**, Oxford, v. 87, p. 85-156, 2005.

MERTENS, T.; HESS, D. Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of temperate region. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, p. 87-99, 1984.

MILLET, E.; FELDMAN, M. Yield response of common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.80, p.255-259, 1984.

OGÜT, M.; AKDAG, C.; DUZDEMIR, O.; SAKIN, A. M. Single and double inoculation with *Azospirillum/Trichoderma*: the effects on dry bean and wheat. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v. 41, p.262-272, 2005.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.26, p.1591-1601, 1994.

RAIJ, B.van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997. 285p. (IAC. Boletim n.100)

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v.19, n.3, p.227-247, 2000.

SALA, V.M.R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 123p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, 2002.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p. 345-352, 2005.

SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.245, p.215-222, 2002.

TRIGO IAC-370 Armageddon. **O Agrônomo**, Campinas, n 51, v.1, p.38, 1999.

4 NOVAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA CULTURA DO TRIGO EM INTERAÇÃO COM A ADUBAÇÃO NITROGENADA, NO CAMPO

Resumo

Foi realizado um experimento, em condições de campo, com o objetivo de estudar o efeito da adubação nitrogenada na inoculação de isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes genótipos e identificar os possíveis benefícios propiciados à cultura do trigo. O delineamento experimental utilizado foi de parcelas sub-subdivididas, sendo: na parcela três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*); na sub-parcela dois genótipos de trigo (ITD-19 e IAC-370), e na sub-sub-parcela três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha⁻¹). O inoculante utilizado foi na forma de turfa em pó. Foram avaliados, no estágio de perfilhamento e de maturidade fisiológica: a produção de massa de matéria seca, o N acumulado e o índice de eficiência de utilização do nitrogênio na parte aérea e na colheita: a produtividade de grãos e os principais componentes de rendimento. A inoculação de bactérias endofíticas promoveu benefícios à cultura do trigo, ou seja, aumento do N acumulado no grão, propiciado pela inoculação do isolado IAC-AT-8, e da produtividade de grãos na maior dose de N adicionada (120 kg ha⁻¹), propiciada pelo isolado IAC-HT-11.

Termos para indexação: Genótipos de trigo, Produtividade de grãos, Fixação biológica do N₂.

Abstract

A field experiment was carried out with the aim of evaluating the benefits from inoculation of homologous bacterial strains in wheat under varying nitrogen doses. The experimental set up consisted of a split-split-plot design, with three strains of diazotrophic bacteria (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter*

insolitus and IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*); two wheat genotypes (ITD-19 and IAC370) under three levels of nitrogen fertilizer, in the form of urea (0, 60 and 120 kg ha⁻¹). The carrier of the inoculants was powdered peat. Shoot dry matter and total shoot nitrogen were evaluated at tillering stage and at maturity. Grain yield and the main yield components were evaluated at harvest. Plant inoculation resulted in better growth and yield of wheat. Independent of the cultivar or the level of nitrogen, plants inoculated with the strain IAC-AT-8 presented increases in grain N accumulation. At the highest nitrogen level (120 kg ha⁻¹) the strain IAC-HT-11 increased grain yield.

Index terms: Wheat genotypes, Grain yield, Biological N₂ fixation.

4.1 Introdução

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera, porém indisponível às plantas devido à grande estabilidade da molécula, tornando-se necessária a adição do elemento para uso das plantas através de fertilizantes. Entretanto, grande parte dos fertilizantes nitrogenados adicionados às culturas é perdida via lixiviação, desnitrificação e ainda, pela imobilização microbiana. A deficiência de N causa redução no crescimento, no desenvolvimento das plantas, na produção e na qualidade dos grãos, e , em excesso, pode intensificar o desenvolvimento de doenças fúngicas e influenciar negativamente o crescimento das plantas, além de causar problemas ambientais. Portanto, é de extrema importância a nutrição equilibrada aliada a práticas culturais que visem um sistema de controle integrado, minimizando os gastos com adubação, reduzindo as perdas e a poluição ambiental.

Bactérias promotoras de crescimento de plantas podem auxiliar por diversos mecanismos na nutrição nitrogenada das culturas, entre os quais, produção de hormônios, que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, possibilitando a exploração de maior volume de solo (BASHAN; HOGUIN, 1997; ZAIED et al., 2003), aumento do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo (BODDEY et al., 1986) e ainda, pela fixação biológica do N₂ (FBN) (INIGUEZ et al., 2004).

Existem muitos relatos de respostas positivas da inoculação de bactérias diazotróficas associadas à cultura do trigo (DALLA SANTA et al., 2004; ROESCH et al., 2005), havendo, entretanto, outros relatos em que não houve efeito da inoculação (OGÜT et al., 2005). Mertens e Hess (1984), utilizando uma estirpe de *Azospirillum*, em três anos de experimento de campo, obtiveram aumento na produtividade de grãos, que variou de 8 a 32%, sendo que houve variação entre os anos, e dentro do mesmo ano de cultivo.

A maioria das pesquisas já realizadas demonstra inconsistência de resultados, que é principalmente atribuída a técnicas de inoculação (Bashan, 1986), ao genótipo da planta hospedeira (INIGUEZ ET AL, 2004), às características do solo, como quantidade de matéria orgânica (DOBBELAERE et al., 2002) e à comunidade nativa de microrganismos (BALDANI et al., 1986).

Os isolados IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12 foram obtidos de raízes de trigo desinfetadas superficialmente, sendo estes selecionados devido ao seu desempenho positivo em experimento em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005) e em casa de vegetação com substrato esterilizado (SALA, 2002). Entretanto, muitas vezes os resultados obtidos nessas condições não são repetidos no campo, pois parece haver uma expressiva interação planta-bactéria-ambiente.

Um fator importante para o sucesso da inoculação em experimentos de campo é o estabelecimento e a multiplicação do microrganismo, que terá que competir com os isolados nativos do solo e também com outros microrganismos (BALDANI et al., 1986). Em Israel, onde os solos possuem baixa ou nenhuma comunidade nativa de bactérias diazotróficas endofíticas, as respostas à inoculação são mais consistentes e a recomendação de inoculação pode fazer parte do manejo da cultura (OKON, 1985).

Em países como a Itália e a França, o inoculante é produzido comercialmente e recomendado para a cultura do milho, promovendo resultados positivos independentemente do cultivar ou do tipo de solo e substituindo de 35-40% do adubo nitrogenado (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar, em condições de campo, o efeito da adubação nitrogenada e/ou da inoculação de isolados homólogos de bactérias

diazotróficas endofíticas em dois genótipos de trigo e avaliar os possíveis benefícios propiciados à cultura.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e métodos

O experimento de campo foi instalado em 2003 no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo de Campinas/APTA, em latossolo vermelho eutrófico típico, com irrigação por aspersão.

O delineamento experimental utilizado foi de parcelas sub-subdivididas (1,2 X 24,0m = 28,8m²), com quatro repetições, sendo: na parcela três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas, sendo esses IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12; na sub-parcela dois genótipos de trigo ITD- 19 (*Triticum durum* L.), ineficiente e responsivo quanto ao uso do adubo nitrogenado, e IAC-370 (*Triticum aestivum hard* L.), eficiente e responsivo, e na sub-sub-parcela três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha¹).

O conceito de ineficiente/eficiente se refere ao comportamento da planta na ausência de fertilizante nitrogenado, apresentando menor/maior produção de grãos que a média da população. Já o conceito de responsivo se refere ao aumento da produção de grãos em função do N adicionado ao solo.

Para o preparo dos inoculantes, os isolados foram repicados em meio de cultura líquido acrescido de nitrogênio, sendo esses: NFb (IAC-AT-8) e JNFb (IAC-HT-11 e IAC-HT-12). As culturas cresceram sob agitação constante durante 24 horas. Foi utilizada turfa em pó como carreador, contendo 10⁹ células g⁻¹ de turfa, e misturada na semente no momento do plantio na quantidade de 6,5g de inóculo para 80g de sementes. O plantio foi realizado mecanicamente.

Os isolados utilizados: IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense* (acesso no Genbank n^o DQ386149), isolado em meio NFb, meio de cultura este idealizado para o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus* (acesso no Genbank n^o DQ386150) e IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera* (acesso no Genbank n^o DQ389143), isolados em meio JNFb, idealizado para o isolamento de *Herbaspirillum*,

foram obtidos de raízes desinfetadas superficialmente do genótipo de trigo ITD19, ou seja, são estirpes homólogas (SALA et al., 2005). No estágio de perfilhamento e de maturidade fisiológica foram colhidos em cada parcela experimental 50cm lineares de planta, de uma das linhas centrais, coletando-se a parte aérea das plantas. A produção de massa de matéria seca foi obtida após secagem das plantas em estufa a 60°C com circulação de ar. Posteriormente, procedeu-se à moagem e homogeneização para determinação da concentração de N pelo método micro-Kjeldahl (BREMNER, 1965). Por ocasião da colheita foram avaliados a produtividade de grãos e os principais componentes de rendimento.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa Sanest, fazendo-se análise da variância seguida da comparação das médias pelo teste de Duncan a 5%. Para comparação entre doses de nitrogênio foram feitas regressões polinomiais.

4.2.2 Resultados e discussão

No estágio de perfilhamento, com a adição de N, houve aumento da massa de matéria seca das plantas do genótipo IAC370 com o emprego do isolado IAC-AT-8, nas doses de 60 e 120 kg ha⁻¹ de N, e com o isolado IAC-HT-11, na dose de 120 kg ha⁻¹ de N, em relação ao tratamento testemunha (Figura 13- Tabela 5 do anexo). Houve um ajuste quadrático em relação às doses de N adicionadas com o isolado IAC-AT-8, com ponto de máxima na dose de 77 kg ha⁻¹ de N. Entretanto, para as plantas testemunha e com o emprego do isolado IAC-HT-11, o ajuste foi linear (Figura 13- Tabela 5 do anexo).

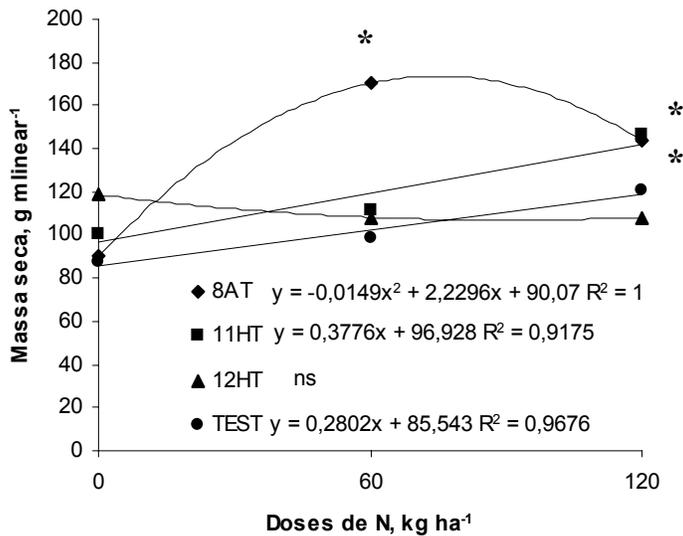


Figura 13 - Massa de matéria seca da parte aérea no estágio de perfilhamento no genótipo IAC370 em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5% isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N

Constatou-se que as plantas na presença do isolado IAC-HT-12, no tratamento sem a adição de N, apresentaram produção de matéria seca superior às plantas da testemunha e similar às plantas cultivadas nas doses 60 e 120 kg ha⁻¹ de N. Possivelmente, o efeito positivo da inoculação deste isolado na ausência de adubo nitrogenado aplicado foi devido à FBN, que supriu às plantas em N, ou à produção de fitormônios, ocasionando um crescimento comparável ao das plantas que receberam N. No genótipo ITD19, no estágio de perfilhamento não houve influência da inoculação sobre a fitomassa (Tabela 5 do anexo). Nesse estágio, independentemente do genótipo, na presença do isolado IAC-AT-8, as plantas apresentaram maior quantidade acumulada de nitrogênio com a adição de 60 kg ha⁻¹ de N em relação ao tratamento testemunha, e houve a mesma tendência quando avaliado o índice de eficiência de utilização de nitrogênio (Figuras 14A e 14B- Tabela 6 do anexo).

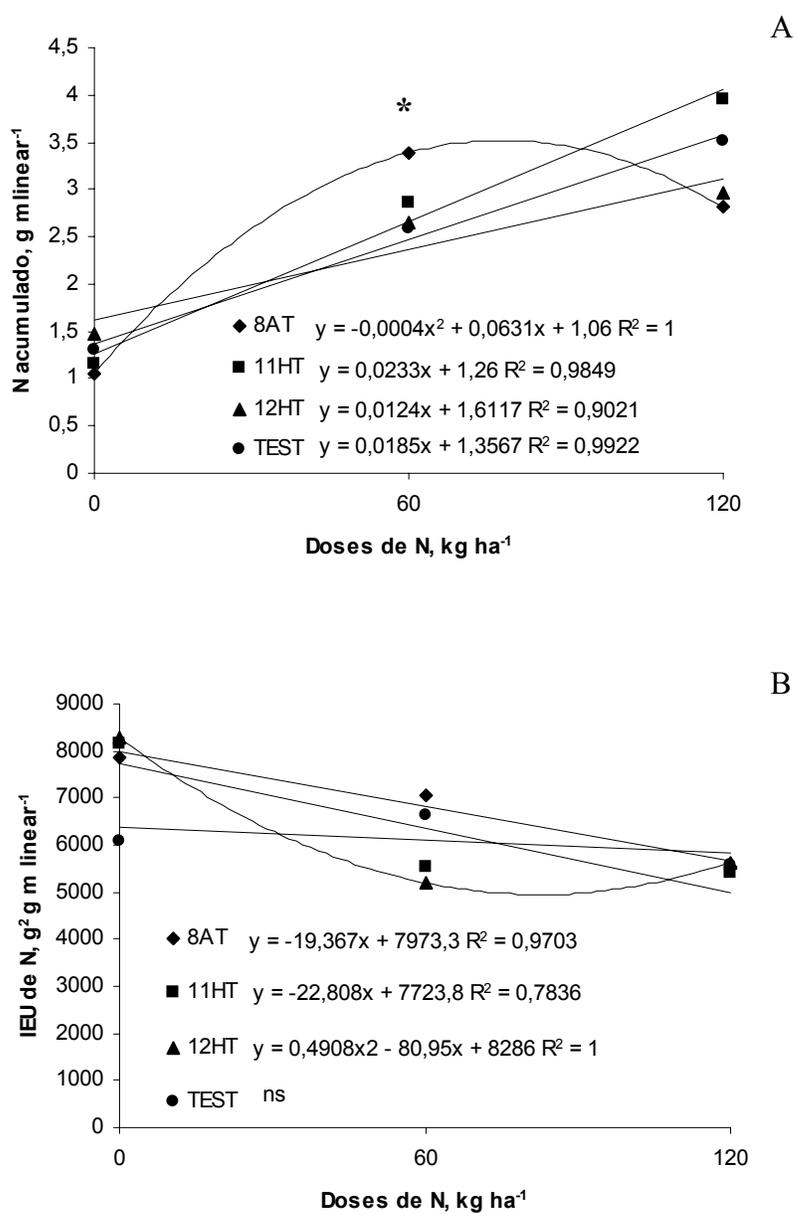


Figura 14 - Quantidade acumulada (A) e índice de eficiência de utilização (B) do nitrogênio na parte aérea no estágio de perfilhamento em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5% isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N

Também, com o emprego do isolado IAC-AT-8, observou-se um ajuste quadrático em relação às doses de N adicionadas, com ponto de máxima na dose de 78 kg ha⁻¹ de N, quando avaliado o nitrogênio acumulado na parte aérea (Figura 14A – Tabela 6 do anexo). Porém, houve um ajuste linear decrescente entre o índice de eficiência de utilização do N sob influência do mesmo isolado e a quantidade de N adicionada (Figura 14B- Tabela 6 do anexo), indicando que o aumento obtido na produção de massa de matéria seca da parte aérea foi proporcionalmente menor ao aumento da dose de N, que passou de 60 para 120 kg ha⁻¹ de N.

No estágio de maturidade fisiológica, independentemente do genótipo ou da dose de N utilizada, com o emprego do isolado IAC-AT-8 houve uma tendência de aumento da massa de matéria seca da folha e do colmo. Na presença do isolado IAC-HT-11 houve aumento da massa das espigas (Tabela 2). Entretanto, houve aumento significativo na quantidade acumulada de N na espiga com o emprego do isolado IAC-AT-8, em relação ao tratamento testemunha (Tabela 2), o que pode significar uma melhor qualidade do grão para panificação, uma vez que, a concentração de N nas sementes está diretamente relacionado ao teor de proteínas.

Tabela 2 - Massa de matéria seca, quantidade acumulada e índice de eficiência de utilização do N, no estágio de maturidade fisiológica, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação

	Massa seca, g m linear ⁻¹		N acumulado, g m linear ⁻¹		IEU do N, g ² m linear ⁻¹	
	folha+colmo	espiga	folha+colmo	espiga	folha+colmo	espiga
IAC-AT-8	87,49A	139,52A	0,547A	2,05A	15282A	10266A
IAC-HT-11	79,93A	134,71A	0,403B	1,79B	16775A	10592A
IAC-HT-12	83,39A	128,91A	0,460AB	1,57B	16800A	10881A
TEST	80,61A	129,22A	0,494AB	1,76B	14147A	9795A

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical

Observou-se uma tendência de aumento no índice de eficiência de utilização do N no estágio de maturidade fisiológica, promovida pela inoculação (Tabela 2). O aumento no índice de eficiência de utilização sem que, no entanto, tenha ocorrido um aumento do N acumulado, como ocorrido com o emprego dos isolados IAC-HT-11 e IAC-HT-12, pode ser um indicativo de uma maior exploração do solo devido a modificações nas raízes propiciadas pela inoculação.

Já foram observados vários efeitos na morfologia das raízes infectadas por bactérias diazotróficas endofíticas, como aumento no comprimento da raiz, no número de ramificações e na superfície radicular e ainda de pêlos radiculares (DOBBELAERE et al., 1999, ROESCH et al., 2005). Apesar de, no presente trabalho, não terem sido avaliadas possíveis modificações nas raízes propiciadas pela inoculação, já foi observado que os isolados empregados promovem aumento no crescimento das raízes de trigo (SALA et al., 2005).

Independentemente do genótipo utilizado, houve aumento na produtividade de grãos na presença do isolado IAC-HT-11 na maior dose de N utilizada (120 Kg ha^{-1}), propiciando um aumento de 17% (580 kg ha^{-1}) em relação ao tratamento testemunha (Figura 15- Tabela 7 do anexo). Houve um ajuste quadrático em relação às doses de N adicionadas para todos os tratamentos empregados.

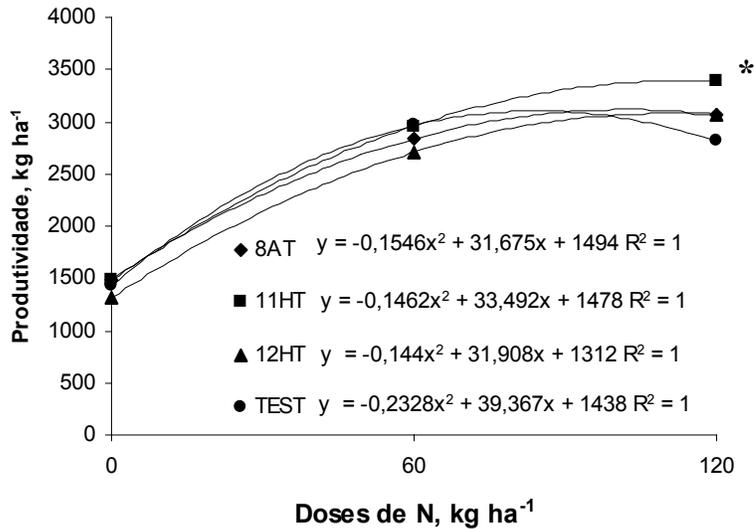


Figura 15 - Produtividade de grãos de trigo em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5% isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N

A produtividade máxima com a inoculação foi obtida com a adição de aproximadamente 110 Kg ha⁻¹ de N, entretanto, no tratamento testemunha o ponto de máxima foi obtido com uma dose inferior de N (85 Kg ha⁻¹ de N), indicando que a partir das doses mencionadas o nitrogênio adicionado não reverteu em aumento de produtividade na cultura do trigo. Ainda, pode-se observar que a produtividade foi praticamente a mesma com a adição de 60 ou 120 Kg ha⁻¹ de N no tratamento testemunha, o que não ocorreu nos tratamentos com os isolados empregados. Uma hipótese seria atribuir esse efeito a alguma modificação fisiológica e/ou morfológica nas plantas de trigo propiciada pela inoculação, sendo que a dose mais alta de N utilizada não representou um consumo de luxo para as plantas na presença dos isolados empregados.

Dos componentes de rendimento avaliados, somente a massa de 100 grãos foi significativamente influenciada pela inoculação (Tabela 3), sendo que, o isolado IAC-AT-8 foi superior aos demais tratamentos.

Tabela 3 - Massa de 100 grãos, N acumulado após o perfilhamento, número de grãos espiga⁻¹, número de espigas m⁻², número de grãos m⁻², índice de colheita para massa de matéria seca e índice de colheita para nitrogênio, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação

Tratamentos	IAC-AT-8	IAC-HT-11	IAC-HT-12	TEST
Massa 100 grãos	5,11A	4,82AB	4,60B	4,73AB
N acumulado após perfilhamento	2,32A	1,28B	1,43B	1,66B
Número grãos espiga ⁻¹	20,24A	20,93A	21,83A	20,44A
Número de espigas m ⁻²	467A	472A	462A	452A
Número de grãos m ⁻²	9558A	10058A	9889A	9164A
Índice de colheita (MMS)	60,87A	62,00A	60,17A	60,96A
Índice de colheita (N)	42,56A	45,05A	42,15A	42,12A

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na horizontal

Provavelmente, esse efeito pode ser atribuído à maior absorção de N no período pós-antese na presença do isolado IAC-AT-8 (Tabela 3), o qual propiciaria uma maior quantidade de N acumulado e maior peso de grãos. Didonet et al. (1996) e Rodrigues et al. (2000) observaram que, em plantas de trigo colonizadas por *Azospirillum* spp., houve maior absorção de N na fase pós-antese, período em que a maior disponibilidade de N não promoveu aumento na produção de grãos.

No estágio de perfilhamento com a adição de 120 Kg ha⁻¹ de N, o isolado IAC-HT-11 promoveu aumento da fitomassa (Figura 13), houve uma tendência de aumento do N acumulado em relação ao tratamento testemunha (Figura 14), e ainda, mostrou a menor quantidade de N acumulado no período após o perfilhamento (Tabela 3), sugerindo que, possivelmente, a maior contribuição propiciada pela inoculação desse isolado foi no período de desenvolvimento vegetativo da cultura, o que poderia

possibilitar um maior afilamento e conseqüentemente um maior número de espigas por m^2 (Figura 16), culminando no aumento da produtividade de grãos.

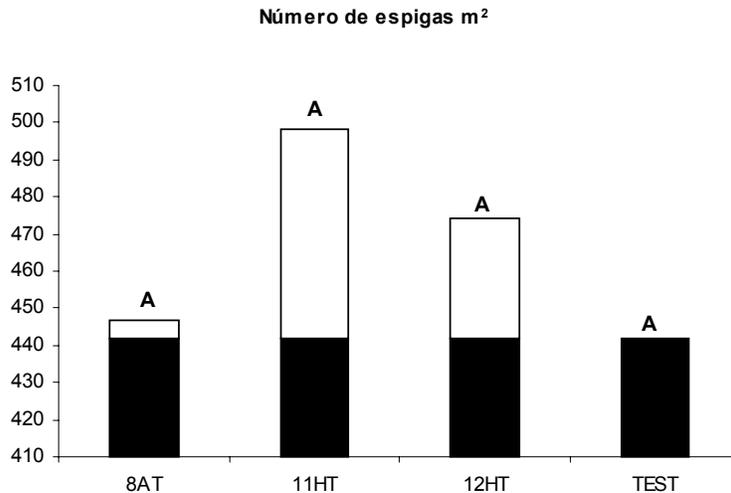


Figura 16- Número de espigas m^{-2} na dose de 120 kg ha^{-1} de N sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8, IAC-HT-11, IAC-HT-12 e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem pelo teste de Duncan a 5%

O aumento da produtividade na cultura do trigo também pode estar relacionado à maior massa de grãos em relação à fitomassa. Os índices de colheita para massa de matéria seca ou para nitrogênio, que são a relação entre a massa de grãos e massa total da planta ou da quantidade acumulada de N no grão e a quantidade total na planta, são indicadores sensíveis da translocação eficiente dos fotossintetizados da parte vegetativa para os grãos (XU et al., 2005). Didonet et al. (2000), já demonstraram aumento do índice de colheita em plantas de trigo na presença de isolados de *Azospirillum* em relação à testemunha. Houve uma tendência de aumento no índice de colheita com a inoculação do isolado IAC-HT-11 (Tabela 3) e houve correlação do índice de colheita para massa de matéria seca ($r = 0,72$ e $p < 0,000001$) e para N acumulado ($r = 0,57$ e $p < 0,0001$) com a produtividade, sendo que esse efeito também pode ser responsável pelo aumento da produtividade de grãos propiciada pelo mesmo isolado.

Alguns autores sugerem que na cultura do trigo a inoculação não substitui o adubo nitrogenado, porém, promove a melhor absorção e utilização do N disponível (OKON, 1985; SAUBIDET et al., 2002). Realmente, o aumento na produtividade propiciada pela inoculação do isolado IAC-HT-11 com a adição de 120 Kg ha⁻¹ de N (Figura 15) sugere que outros mecanismos, que não a fixação biológica de nitrogênio, possam ter contribuído para a resposta positiva à inoculação. Zambre et al. (1984) também obtiveram o máximo de aumento na produtividade de grãos, em experimento de campo, com plantas de trigo que receberam 120 Kg ha⁻¹ de N e outros trabalhos relatam aumentos com a adição de 100% do N recomendado para a cultura (REYNDERS; VLASSAK, 1982; MILLET; FELDMAN, 1984; DALLA SANTA et al., 2004). O aumento da produtividade na maior dose de N adicionada também poderia ser atribuída a uma possível seleção natural e/ou uma adaptação na associação planta-bactéria diazotrófica, uma vez que o isolado IAC-HT-11 foi obtido de plantas de trigo na presença de adubação nitrogenada (SALA et al., 2005).

Apesar da inoculação do isolado IAC-HT-11 não sugerir que deva ocorrer uma redução no N adicionado como fertilizante, o mesmo reverte em lucro para o agricultor. Admitindo-se que o preço médio da tonelada da uréia é de R\$980,00 (preço médio praticado no mercado de Campinas-SP) e do trigo R\$350,00 (CONAB), a dose econômica recomendada para o tratamento testemunha seria de 71,47 kg ha⁻¹ de N e com o isolado IAC-HT-11 de 93,74 kg ha⁻¹ de N, obtendo-se uma produtividade de grãos de 3062 kg ha⁻¹ e de 3333 kg ha⁻¹, respectivamente. Assim, baseando-se no preço do inoculante usado para cultura da soja, o gasto com a inoculação seria de R\$5,40 ha⁻¹ (LOPES¹, comunicação pessoal), proporcionando um lucro de R\$42,00 ha⁻¹ com o emprego do isolado IAC-HT-11 em relação ao tratamento testemunha, mesmo utilizando uma maior quantidade de uréia.

Entretanto, considerando a quantidade de grãos produzida com a adição de 120 kg ha⁻¹ de N subtraída daquela produzida na dose 0 de N, verificou-se que para cada quilo de N aplicado a inoculação propiciou aumento na produção de grãos, sendo que esses aumentos variaram de 1,70 kg, com o emprego do isolado IAC-AT-8, até 4,50 kg com o isolado IAC-HT-11, em relação ao tratamento testemunha.

¹LOPES, E.S. Bio Soja. São Joaquim da Barra-SP. <<http://www.biosoja.com.br>>

Ainda, considerando um gasto médio com o inoculante de R\$5,40 ha⁻¹ e o preço do trigo de R\$350,00 a tonelada, aumentos acima de 15,43 kg ha⁻¹ de grãos já justificariam a prática da inoculação. Os aumentos obtidos com a inoculação, na dose de 120 kg ha⁻¹ de N, foram de 250 a 580 kg ha⁻¹ de grãos, em relação ao tratamento testemunha (Figura 15- Tabela 7 do anexo). Subtraindo-se o gasto com o adubo (120kg = R\$256,00) e com a inoculação (R\$5,40), seriam obtidos lucros de R\$ 85,00 ha⁻¹ com os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-12 e de R\$ 200,00 ha⁻¹ com o isolado IAC-HT-11, justificando a pratica da inoculação nessa dose de N .

Provavelmente, a comunidade nativa de microrganismos e/ou as condições de cultivo influenciaram as respostas à inoculação pois, apesar de o isolado IAC-HT-11 ter causado aumento significativo da produtividade de grãos, em experimento prévio em casa de vegetação com substrato esterilizado, duplicou a massa de matéria seca, quantidade acumulada e índice de eficiência de utilização do N em plantas de trigo (SALA, 2002), entretanto isto não ocorreu no presente trabalho realizado em condições de campo. Realmente, segundo Dobbelaere et al. (2002), os experimentos de campo precisam ser repetidos várias vezes para que respostas mais conclusivas possam ser obtidas.

4.3 Conclusões

- ✓ A cultura do trigo é beneficiada pela inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas.
- ✓ O genótipo da planta não influenciou as principais respostas obtidas com a inoculação.
- ✓ O isolado IAC-AT-8 promoveu o aumento na qualidade de grãos, com maior quantidade acumulada de N.
- ✓ O isolado IAC-HT-11, de *Achromobacter insolitus*, descoberto recentemente como endófito de plantas de trigo, promoveu aumento da produção de grãos.
- ✓ A inoculação promoveu aumento da produtividade de grãos na maior dose de N utilizada, o que representa maior retorno econômico para o agricultor, apesar de não propiciar uma economia na quantidade de N adicionado.

Referências

BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p. 35-46, 1986.

BASHAND, Y.; HOGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.

BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. On nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.109-121, 1986.

BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.) **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1149-1178.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Disponível em: http://www.conab.gov.br/download/comercializacao/precos_com/precos_2006/COMU_406.doc. Acesso em: 04 Ago. de 2006.

DALLA SANTA, O R., HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, p. 843-850, 2004.

DIDONET, D.A.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa de matéria seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.9, p.645-651, 1996.

DIDONET, D.A.; LIMA, O .S.; CANDATEN, M.H. RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.2, p.401-411, 2000.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v.36, p.284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V., VANDERLEYDEN. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.212, p.155-164, 1999.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

MERTENS, T.; HESS, D. Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.82, p. 87-99, 1984.

MILLET, E.; FELDMAN, M. Yield response of common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.80, p.255-259, 1984.

OGÜT, M.; AKDAG, C.; DUZDEMIR, O.; SAKIN, A. M. Single and double inoculation with *Azospirillum/Tricoderma*: the effects on dry bean and wheat. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v. 41, p.262-272, 2005.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, London, v.3, p.223-228, 1985.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.26, p.1591-1601, 1994.

REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.66, p.217-273, 1982.

RODRIGUES, O.; DIDONET, D.A.; GOUVEIA, J.A.; SOARES, R.C. Translocação de nitrogênio em trigo infectado por *Azospirillum* e adubado com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.7, p.1473-1481, 2000.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O ; SELBACH, P.A, SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35 , p. 1201-1204, 2005.

SALA, V.M.R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrizicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 123p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, 2002.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO. P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p. 345-352, 2005.

SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.245, p.215-222, 2002. ZAIED, K.A.; EL-HADY, A H.; AFIFY, A H.; NASSEF, M. A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Pakistan, v.4, p.344-358, 2003.

ZAMBRE, M.A.; KONDE, B.K.; SONAR, K.R. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 79. p. 61-67, 1984.

Xu, Z.Z.; Yu, Z.W.; Wang, D.; Zhang, Y.L. Nitrogen accumulation and translocation for winter wheat under different irrigation regimes. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Braunschweig, v.. 191, p 439-444, 2005.

5 PRODUÇÃO DE INDÓIS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TRIGO.

Resumo

Os benefícios propiciados às plantas pela inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas podem estar relacionados à capacidade de síntese de fitormônios pelas bactérias e não à fixação biológica do nitrogênio. Foi realizado um experimento em condições de campo com o objetivo de estudar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas, relacionando a capacidade de síntese de indóis pelas mesmas com os possíveis benefícios à cultura do trigo. A análise da produção de indóis foi realizada por método colorimétrico em cultura pura de células. O delineamento experimental utilizado no experimento de campo foi de parcelas subdivididas, sendo: na parcela três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha⁻¹) e na sub-parcela três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*). Foram avaliados, nos estádios de perfilhamento e de maturidade fisiológica: a produção de massa de matéria seca, o N acumulado e na colheita: a produtividade de grãos e os principais componentes de rendimento. As maiores respostas à inoculação foram obtidas com a adição de adubo nitrogenado (60 kg ha⁻¹). Independentemente da quantidade de indóis que os isolados utilizados foram capazes de sintetizar, a inoculação propiciou benefícios para a cultura do trigo, demonstrando que a análise da capacidade de síntese de indóis em cultura pura de células não é um bom parâmetro para seleção de isolados promissores.

Termos para indexação: Fitormônios, *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Zoogloea*.

Abstract

The plants' benefits from inoculation of endophytic diazotrophic bacteria might result from their potential of indole synthesis instead of biological nitrogen fixation. A field experiment was carried out with the aim of evaluating the effects of inoculation of

endophytic diazotrophic bacteria and their benefits on wheat plants, relating them to their potential of indole synthesis. Indoles syntheses in cell cultures were evaluated using a colorimetric methodology. The experimental set up in the field experiment consisted of a split-plot design, with three strains of diazotrophic bacteria (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*); under three levels of nitrogen fertilizer, in the form of urea (0, 60 120 kg ha⁻¹). Shoot dry matter and total shoot nitrogen were evaluated at tillering stage and at maturity stage. Grain yield and the main yield components were evaluated at harvest. The main benefits from bacterial inoculation to wheat plants were obtained with N fertilizer (60 kg ha⁻¹). Independent of the strains ability of indoles synthesis, the benefits brought about by bacterial inoculation was totally independent from their indole production. Therefore one can infer that indole production is not a good parameter for the screening of effective strains.

Index terms: Phytohormone, *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Zoogloea*.

5.1 Introdução

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são capazes de promover benefícios às plantas às quais estão associadas, utilizando mecanismos diretos e/ou indiretos (BASHAN; DE-BASHAN, 2005). No primeiro caso, a promoção de crescimento das plantas é diretamente influenciada pela bactéria, pela produção de compostos sintetizados pela mesma ou facilitando a absorção de determinados nutrientes escassos no ambiente. Já o critério indireto, ou mecanismo indireto, está relacionado com bactérias capazes de atuar como agentes de controle biológico, prevenindo ou reduzindo os danos causados por microrganismos fitopatogênicos.

Assim sendo, bactérias diazotróficas endofíticas poderiam ser classificadas como BPCPs, uma vez que estão associadas às plantas hospedeiras sem causar reação de defesa a sua presença, atuando por mecanismos diretos de promoção de crescimento, principalmente pela fixação biológica do nitrogênio (FBN) e pela produção de fitormônios. Além disso, parece evidente que bactérias diazotróficas endofíticas possuem vantagens que o interior da planta pode proporcionar, como maior acesso a

fontes de carbono produzidas pela planta, uma menor pressão de O₂, essencial para o funcionamento da nitrogenase e portanto, para que ocorra a FBN, ou ainda, pela menor competição com outros microrganismos do solo (LODEWYCKX et al., 2002).

As bactérias diazotróficas mais estudadas como BPCPs associativas, ou seja, que não formam uma simbiose com a planta hospedeira, são as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* (BASHAN; DE-BASHAN, 2005).

Tratando-se de bactérias diazotróficas, acreditava-se que a fixação de N₂ na ecto ou na endorrizosfera e a liberação de parte do nitrogênio fixado para a planta fossem os principais modos de ação sobre o hospedeiro. Entretanto, observam-se respostas positivas à inoculação dessas bactérias, sem que esses efeitos possam ser atribuídos à FBN (KALPULNIK et al, 1983). Uma hipótese para os benefícios causados por essas bactérias pode ser sua capacidade de síntese de fitormônios.

Foram observadas várias modificações na morfologia das raízes das plantas devido à inoculação de isolados de *Azospirillum* spp., como aumento em número, comprimento, área e aumento na absorção mineral, que podem estar relacionadas a substâncias promotoras de crescimento secretadas pela bactéria (MARTIN et al., 1989, ROESCH et al., 2005). Bhattarai e Hess (1998) concluíram que, ao lado da FBN, o efeito de estimulação do crescimento pela bactéria no desenvolvimento das raízes, nos primeiros estádios de crescimento da planta, pode ser responsável pelo impacto positivo da inoculação em trigo.

Foi observado que os isolados IAC-AT-8 de *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11 de *Achromobacter insolitus* e IAC-HT-12 de *Zoogloea ramigera*, obtidos de raízes de plantas de trigo desinfetadas superficialmente, promoveram aumento no crescimento das raízes de plantas de trigo em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005).

Já foi demonstrado que isolados do gênero *Azospirillum* podem sintetizar auxinas, citoquininas e giberelinas (BASHAN et al., 2004). As auxinas são os fitormônios mais comumente sintetizados por diversos grupos de microrganismos, sendo que o principal é o ácido indol acético (AIA), o qual, inclusive já foi observado em cultura pura de células de isolados de bactérias pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Zoogloea* (TSAVKELOVA et al., 2006).

Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar, os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em condições de campo, relacionando-os com sua capacidade de sintetizar indóis.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Material e métodos

5.2.1.1 Análise da produção de indóis

Os isolados utilizados: IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense* (acesso no Genbank nº DQ386149), IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus* (acesso no Genbank nº DQ386150), IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera* (acesso no Genbank nº DQ389143); foram selecionados devido ao seu desempenho positivo em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005) e em casa de vegetação com substrato esterilizado (SALA, 2002). Os mesmos foram obtidos nas raízes de plantas de trigo desinfetadas superficialmente, ou seja, são estirpes homólogas.

A análise da produção de indóis foi realizada por método colorimétrico baseado em Pilet e Chollet (1970). Os isolados foram repicados em meio de cultura líquido, ágar-nutriente, com adição de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de L-triptofano ou não, incubados sob agitação constante no escuro. Após a centrifugação das culturas a 10.000g por 15 minutos, a 4°C , foi avaliada a produção de indóis no sobrenadante da cultura dos isolados, após 24 e 48 horas de inoculação, pela leitura da absorbância a 530 nm. A concentração de indóis foi calculada de acordo com a curva padrão, utilizando-se concentrações conhecidas de AIA (Sigma), de 25, 50, 100, 150, 200 e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$.

5.2.1.2 Experimento de campo

O experimento de campo foi instalado em 2005, no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo de Campinas/APTA, em latossolo vermelho eutrófico típico, com irrigação por aspersão.

As adubações de P, K e micronutrientes foram feitas baseadas na tabela de recomendação de adubação para a cultura do trigo irrigado para o Estado de São Paulo (RAIJ et al., 1997), conforme as análises de solo (profundidade 0-20 cm): NH_4 12,37 e NO_3 3,93 mg kg^{-1} , MO 41 g dm^3 , pH em CaCl_2 5,4, P 76 mg dm^3 , K 5,3, Ca 44, Mg 16, H+Al 31, S.B. 65,3, C.T.C 96 mmolc dm^3 , V% 68, B 0,29, Cu 6, Fe 14, Mn 57 e Zn 4,3 mg dm^3 .

O delineamento experimental utilizado foi de parcelas subdivididas (1,2 X 24,0m = 28,8m²), com seis repetições, sendo: na parcela três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha^{-1}), na sub-parcela três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas, sendo IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12. O genótipo de trigo utilizado foi o IAC-370, *Triticum aestivum hard* L.

Para o preparo dos inoculantes, os isolados foram repicados em meio de cultura líquido acrescido de nitrogênio, sendo: NFb (IAC-AT-8) e JNFb (11 e IAC-HT-12) (DÖBEREINER et al., 1995), nos quais foram originalmente isolados. As culturas cresceram sob agitação constante durante 24 horas. Foi utilizado turfa em pó como carreador, contendo 10^9 células g^{-1} de turfa, e misturado na semente no momento do plantio; foram utilizados 6,5g de inóculo para 80g de sementes.

No estágio de perfilhamento e de maturidade fisiológica foram colhidos em cada parcela experimental 50cm lineares de planta, de uma das linhas centrais, coletando-se a parte aérea das plantas. A produção de massa de matéria seca foi obtida após secagem das plantas em estufa a 60°C com circulação de ar. Posteriormente, procedeu-se à moagem e homogeneização para determinação da concentração de N pelo método micro-Kjeldahl (BREMNER, 1965).

Também, no estágio de perfilhamento foi avaliada a atividade da redutase do nitrato “in vivo”, que consiste em infiltrar o tecido vegetal em uma solução contendo nitrato, possibilitando a quantificação de nitrito produzido na reação que se difunde para o meio de infiltração (REED et al., 1980). Foram utilizados 200 mg de discos foliares e 5 mL de substrato tamponado (200 mM KNO_3 em tampão fosfato 50 mM pH 7,5) acrescido de 0,5% de Tween-20. Os tubos de ensaio com tampas de rosca semi-abertas, foram submetidos a vácuo 3 vezes por 2 minutos. A seguir, os tubos vedados foram incubados por 1 h a 37 °C, no escuro. Após a filtração, foi tomada uma alíquota

de 1 mL e a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 2 N e 1 mL de α -naftilenodiamino 0,05%. Após 5 minutos foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm.

O cálculo do nitrogênio derivado da fixação biológica foi realizado por método não-isotópico (GALAL et al., 2000). Por ocasião da colheita foram avaliados a produtividade de grãos e os principais componentes de rendimento.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Sanest, fazendo-se análise da variância seguida da comparação das médias pelo teste de Duncan a 5%.

5.2.2 Resultados e discussão

5.2.2.1 Análise da produção de indóis

O método colorimétrico foi reavaliado por Glickmann e Dessaux (1995), que demonstraram que esse método não pode ser considerado específico para quantificar a produção de ácido indol acético (AIA), uma vez que também mede a produção de ácido indol pirúvico e indol acetamina, os quais possuem estruturas similares ao AIA, devendo-se utilizar o termo genérico “produção de indóis”. Entretanto, Radwan et al. (2002), comparando esse método com a metodologia que utiliza HPLC (cromatografia líquida de alta pressão), concluem que o método colorimétrico é um método mais simples, permitindo que a produção de indóis possa ser detectada e quantificada.

A produção de indóis pelos isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-12 foi estimulada pela adição de L-triptofano (trp) ao meio de cultivo. Entretanto, somente após 48hs da inoculação do isolado IAC-HT-11 foi possível observar um discreto aumento na produção de indóis na presença desse aminoácido (Tabela 4). Também, Balota et al. (1997) observaram que a produção de AIA por uma bactéria diazotrófica, a qual denominaram de bactéria-E, somente foi influenciada pela adição de trp ao meio de cultivo após 48hs da inoculação. Uma hipótese seria atribuir esse efeito ao fato de que a máxima formação de indóis ocorre após a fase log de crescimento, resultante de modificações fisiológicas do metabolismo das bactérias, sendo sintetizada maior quantidade de indóis para regular suas funções fisiológicas devido a exaustão do

carbono disponível (Omay et al., 1993).

Tabela 4 - Produção de indóis por bactérias diazotróficas endofíticas após 24 e 48 hs da inoculação, utilizando-se meio de cultura com e sem a adição de L-triptofano (trp)

Tratamentos					
Isolados	Sem trp	Com trp	Sem trp	Com trp	Média
	24 hs	24 hs	48 hs	48 hs	
Indóis, $\mu\text{g ml}^{-1}$					
IAC-AT-8	10,92Ab	58,39Aa	3,44Ab	81,18Aa	38,48A
IAC-HT-11	4,97Ba	4,60Ca	3,50Ab	7,47Ca	5,14C
IAC-HT-12	3,62Bb	43,42Ba	3,56Ab	34,32Ba	21,23B

^{1/} Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. Letras maiúsculas são para comparação entre as bactérias na vertical, e letras minúsculas são para comparação entre os tratamentos com e sem adição de L-triptofano dentro da mesma quantidade de horas de incubação e do mesmo isolado bacteriano

Somente foi encontrado um relato antigo na literatura da produção de indóis por um isolado obtido da parte aérea de uma planta de ervilha, identificado por características morfológicas e fisiológicas, pertencente ao gênero *Achromobacter* (LIBBERT; RISCH, 1968). Entretanto, os autores não mostram os valores obtidos nessa análise. Uma hipótese seria que a baixa produção de indóis pelo isolado IAC-HT-11 poderia ser atribuída ao meio de cultivo utilizado. Radwan et al. (2002), utilizando diferentes meios de cultura, quanto à disponibilidade de nutrientes e oxigênio, observaram que as quantidades de AIA produzidas por isolados de *Herbaspirillum* variavam dependendo do meio de cultivo empregado, sugerindo que as condições experimentais poderiam não ser apropriadas para todos os isolados quanto à síntese de AIA.

O isolado IAC-HT-12 de *Zoogloea ramigera* apresentou aumento da produção de indóis com a adição de trp de, aproximadamente, 90% em relação ao meio sem trp. Malik et al. (1997) observaram que um isolado pertencente ao gênero *Zoogloea*, denominado de Ky-1, obtido das raízes não desinfetadas superficialmente de uma

gramínea, produzia $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA em cultura pura de células, porém, os autores não avaliaram a produção na presença de trp.

L-triptofano é um aminoácido que atua como precursor para biossíntese de auxinas, tanto por plantas como por microrganismos. Os exsudatos radiculares são uma fonte natural desse elemento, estimulando continuamente a produção de indóis pelos microrganismos, sendo que o ácido indol acético (AIA) é a auxina mais comumente produzida por diversos grupos de microrganismos (TSAVKELOVA et al., 2006). Atualmente, são conhecidas três rotas metabólicas utilizadas por bactérias do gênero *Azospirillum* para síntese de AIA, sendo duas rotas dependentes de trp, denominadas IAM (índol-3-acetamida) e IpyA (índol-3-piruvato) e somente uma rota não dependente desse precursor (LAMBRECHET et al., 2000).

Já foi demonstrado que a adição de trp aumentou em dez vezes a produção de AIA por isolados de *Azospirillum* (PRINSEN et al., 1993), sendo que no presente trabalho esse aumento ainda foi maior, principalmente após 48hs de incubação, cerca de 23 vezes em relação ao meio de cultivo sem a adição desse aminoácido. Esse dado é semelhante ao valor observado por Radwan et al. (2002) que obtiveram aumentos de até 24 vezes com a adição de trp ao meio de cultura, após 48hs da inoculação de um isolado de *Azospirillum* sp.

Independentemente da adição de L-triptofano e do número de horas após a inoculação, os isolados empregados diferiram quanto à produção de indóis em cultura pura (Tabela 4). Com o objetivo de facilitar a discussão dos dados de campo, os isolados foram classificados como alto produtor de indóis (A), isolado IAC-AT-8 de *Azospirillum brasiliense*, médio produtor de indóis (M), isolado IAC-HT-12 de *Zoogloea ramigera* e baixo produtor de indóis (B), isolado IAC-HT-11 de *Achromobacter insolitus*.

5.2.2.2 Experimento de campo

No estágio de perfilhamento, os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-12 promoveram o aumento da massa de matéria seca e N acumulado na parte aérea das plantas de trigo, independentemente da dose de nitrogênio utilizada (Figura 17). Somente o isolado IAC-

HT-11, o qual apresentou a menor produção de indóis, não diferiu do tratamento testemunha.

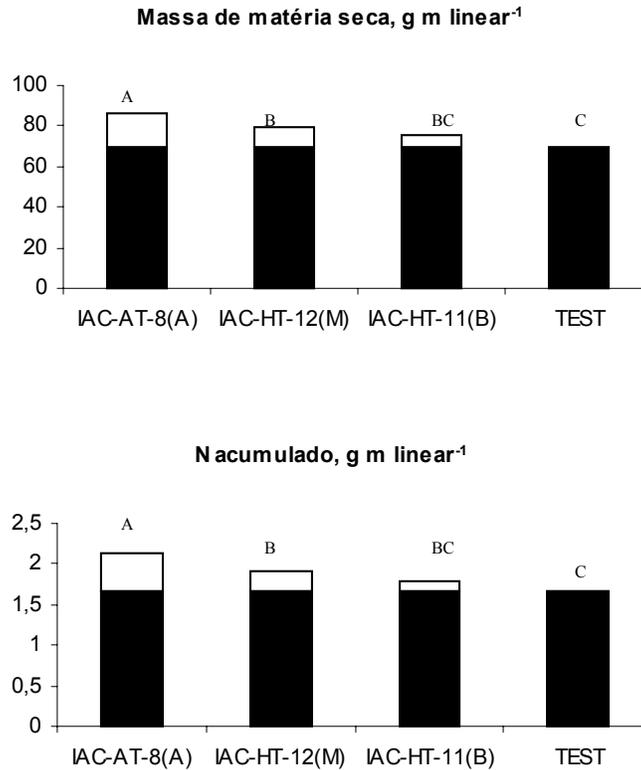


Figura 17 - Massa de matéria seca e N acumulado na parte aérea de plantas de trigo, no estágio de perfilhamento, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

As bactérias do gênero *Azospirillum* já foram extensivamente estudadas quanto à produção de indóis. Existem vários relatos que essas bactérias são capazes de interferir no desenvolvimento das raízes de trigo, aumentando a proliferação das raízes laterais e dos pêlos radiculares, sendo que esse efeito é mais proeminente nos primeiros estádios de desenvolvimento das plantas podendo ser responsável pelo efeito positivo da inoculação (BHATTARAI; HESS, 1998).

Possivelmente, os isolados capazes de sintetizar as maiores quantidades de indóis em cultura pura, IAC-AT-8(A) e IAC-HT-12(M), foram mais eficientes em promover aumento do crescimento e da quantidade de N acumulado devido a

modificações no sistema radicular das plantas, nos primeiros estádios de desenvolvimento da cultura, o que poderia permitir uma maior exploração do solo e, conseqüentemente, uma maior absorção de nutrientes.

Independentemente da dose de N adicionada, houve um pequeno incremento na atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas na presença dos isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-11 (Figura 18). Já foi demonstrado por Baldani et al. (1986), utilizando mutantes NR^- , que os benefícios propiciados por uma estirpe de *Azospirillum* não eram devido à fixação biológica do N, mas pela maior absorção de N do solo propiciada pelo aumento da atividade dessa enzima. Entretanto, ainda não existem estudos da atividade da enzima redutase do nitrato em plantas com a inoculação de bactérias do gênero *Achromobacter*.

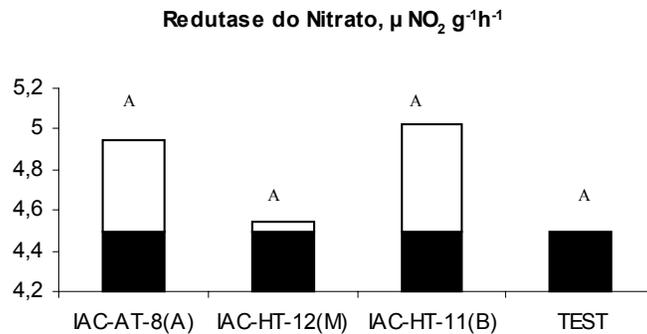


Figura 18 - Atividade da enzima redutase do nitrato na parte aérea de plantas de trigo, no estágio de perfilhamento, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

No estágio de maturidade fisiológica, quando se utilizou uma dose intermediária de N ($60 kg ha^{-1}$ de N), todos os isolados empregados promoveram o aumento na massa de matéria seca na parte aérea, assim como da quantidade acumulada de N no colmo e nas folhas. Porém, quando se utilizaram $120 kg ha^{-1}$ de N, somente as plantas na presença do isolado IAC-HT-11 diferiram da testemunha (Tabela 5).

Tabela 5 - Massa de matéria seca e N acumulado da parte aérea, no estágio de maturidade fisiológica, em função de três doses de N, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação

Tratamentos	Doses de N, kg ha ⁻¹		
	0	60	120
Colmo+Folha	Massa de matéria seca, g m linear ⁻¹		
IAC-AT-8(A)	40,02 B	56,62 A	65,84 B
IAC-HT-12(M)	55,56 A	59,12 A	63,4 B
IAC-HT-11(B)	52,72 A	57,98 A	78,3 A
TEST	47,88 AB	46,14 B	63,76 B
Espiga			
IAC-AT-8(A)	60,4 B	115,42 A	118,48 AB
IAC-HT-12(M)	80,48 A	107,04 A	122,88 AB
IAC-HT-11(B)	73,56 AB	104,56 A	127,02 A
TEST	79,92 A	86,48 B	108,06 B
	N acumulado, g m linear ⁻¹		
Colmo+Folha			
IAC-AT-8(A)	0,162 A	0,309 A	0,403 B
IAC-HT-12(M)	0,239 A	0,344 A	0,398 B
IAC-HT-11(B)	0,249 A	0,316 A	0,528 A
TEST	0,205 A	0,210 B	0,469 B

^{1/}As letras são para comparação entre os tratamentos na vertical. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

Já foi observado que estes três isolados promovem aumento no crescimento das raízes de plantas de trigo em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005), inclusive o isolado IAC-HT-11 de *Achromobacter insolitus*, o qual apresentou a menor capacidade de síntese de indóis em cultura pura de células.

Algumas hipóteses poderiam explicar o efeito benéfico da inoculação desse isolado, em uma fase mais tardia da cultura. Assim, Bertrand et al. (2000), isolaram uma bactéria do gênero *Achromobacter* da rizosfera de plantas de canola e observaram que a inoculação estimulou o sistema de transporte de íons pelas raízes, proporcionando maior absorção de nitrato, além de causar aumento da massa e da área das raízes devido ao aumento dos pêlos radiculares. Os autores também sugerem que o aumento na absorção de íons pode ser devido a modificações na demanda nutricional da planta quando associada à bactéria.

De acordo com Mantelin e Touraine (2004), a absorção de nitrogênio e a estrutura das raízes das plantas são influenciadas por bactérias promotoras de crescimento (BPCP), assim como pela disponibilidade de nitrogênio no solo. O efeito propiciado por BPCPs na absorção de nitrogênio e no desenvolvimento das raízes é similar ao observado em situação de baixa disponibilidade de N, ou seja, aumento do desenvolvimento de raízes laterais e estimulação da absorção de N.

Além disso, a quantificação da síntese de indóis em cultura pura de células pode não significar a realidade em condições de campo, uma vez que os fatores ambientais podem influenciar o metabolismo das plantas e, conseqüentemente, das bactérias a elas associadas, interferindo na regulação desse processo.

Independentemente da dose de nitrogênio utilizada, houve aumento no N acumulado na espiga com a inoculação do isolado IAC-HT-12 (Figura 19), o que pode representar melhor qualidade do grão para panificação devido ao aumento no teor de proteínas. Apesar de todos os isolados utilizados terem promovido aumento na quantidade de N acumulado nas folhas e colmo, possivelmente com a inoculação do isolado IAC-HT-12 as plantas foram mais eficientes em translocar seus fotossintetizados das partes vegetativas para os grãos.

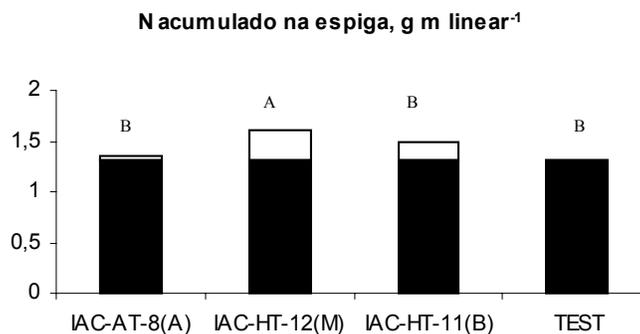


Figura 19 - N acumulado na espiga, no estágio de maturidade fisiológica, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

Independentemente da dose de N utilizada, a massa de cem grãos e o número de grãos por espiga foram influenciadas pelo emprego dos inoculantes (Figura 20). Os grãos das plantas com os isolados IAC-AT-8 e IAC-AT-11 apresentaram maior massa que o tratamento testemunha, o que pode ser devido a uma melhor distribuição do N na planta, demonstrando o melhor aproveitamento da biomassa em benefício da produção de grãos.

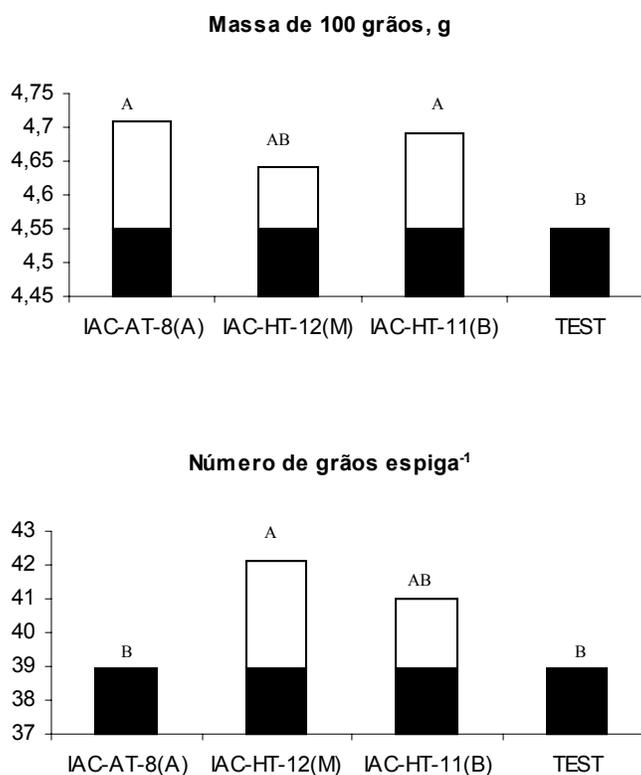


Figura 20 - Massa de cem grãos e número de grãos por espiga de plantas de trigo, na ocasião da colheita, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

O emprego do isolado IAC-HT-12 propiciou aumento no número de grãos por espiga. Esse dado parece confirmar que esse isolado foi o mais eficiente na utilização do N (Figura 20), culminando na maior quantidade de grãos por espiga.

A inoculação promoveu o aumento da produtividade de grãos independentemente da dose de nitrogênio empregada (Tabela 6). Entretanto, observou-se uma tendência de aumento da produtividade de 500 a 900 kg ha⁻¹ pela inoculação quando foram utilizados 60 Kg ha⁻¹ de N, o que representa um incremento de, aproximadamente, 17 a 30 % em relação à testemunha. Nesta dose intermediária de N, também ocorreu estímulo do crescimento e da absorção de N pelas plantas de trigo (Tabela 5). As evidências sugerem que bactérias diazotróficas isoladas de plantas não

leguminosas não substituem a adubação nitrogenada (OKON, 1985; SAUBIDET et al., 2002), sendo que a ausência de fertilizante nitrogenado adicionado pode representar um alto custo da associação para a planta em uma condição de baixo nível de N no solo.

Tabela 6 - Produtividade de grãos, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas

Tratamentos	Doses de N, kg ha ⁻¹			
	0	60	120	Média
	Produtividade, kg ha ⁻¹			
IAC-AT-8(A)	2795 A	3620 A	4336 A	3584 A
IAC-HT-12(M)	2662 A	3999 A	4199 A	3620 A
IAC-HT-11(B)	2619 A	3877 A	4498 A	3665 A
TEST	2420 A	3088 A	4233 A	3247 B

^{1/}As letras são para comparação na vertical. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

Kaushik et al. (2002), verificaram maior aumento da produtividade de grãos em plantas de trigo pela inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* nas doses mais baixas de N utilizadas (0 e 40 kg ha⁻¹ de N). Sugeriram que altas doses de nitrato podem causar a destruição catalítica do ácido indol acético, inibindo a promoção de crescimento das plantas propiciada por *Azospirillum*. Já Radwan et al. (2004) demonstraram que a adição de nitrogênio nas formas amoniacais, ao invés de diminuir a produção de indóis, como ocorria para o N adicionado na forma de nitrato, estimulava a síntese de indóis por isolados do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. No presente trabalho o fertilizante nitrogenado utilizado foi a uréia, que gera amônia como fonte de N para a planta.

Os isolados empregados foram mais eficientes na utilização do nitrogênio quando na presença de 60 kg ha⁻¹ de uréia, revertendo em aumento da produtividade

de grãos. Considerando a quantidade de grãos produzida nessa dose, subtraindo a quantidade produzida na dose 0 de N (Tabela 6), verificou-se que para cada quilo de N adicionado, a inoculação promoveu aumento na produção de grãos em relação ao tratamento testemunha, sendo que esse aumento foi de 2,62 kg com o isolado IAC-AT-8, 9,82 kg com o IAC-HT-11 e 11,15 kg com o IAC-HT-12.

Admitindo-se que o preço médio da tonelada do trigo é de R\$350,00 (CONAB) e considerando um gasto médio com o inoculante de R\$5,40 ha⁻¹ (LOPES¹ comunicação pessoal), aumentos acima de 15,43 kg ha⁻¹ de grãos já justificariam a prática da inoculação. Os aumentos obtidos com a inoculação na dose de 60 kg ha⁻¹ de N variaram de 500 a 900 kg ha⁻¹ de grãos em relação ao tratamento testemunha (Tabela 6). Considerando o preço médio da tonelada da uréia é de R\$980,00 (preço médio praticado no mercado na região de Campinas-SP), subtraindo-se o gasto com o adubo e com a inoculação, seriam obtidos lucros de R\$ 180,00 ha⁻¹ com o isolado IAC-AT-8, de R\$ 313,00 ha⁻¹ com o isolado IAC-HT-12 e de R\$ 270,00 ha⁻¹ com o isolado IAC-HT-11.

Conforme discutido acima, vários mecanismos podem ser responsáveis pelos benefícios propiciados às plantas pela inoculação de bactérias promotoras de crescimento, atuando isoladamente ou em conjunto. No presente trabalho o incremento na produção não poderia ser explicado exclusivamente pela produção de indóis, visto que o isolado IAC-HT-11, propiciou os mesmos benefícios apesar da baixa produção de indóis. Entretanto, aumentos na atividade da enzima redutase do nitrato (BODDEY et al., 1986) e também a fixação biológica do N₂ (INIGUEZ et al., 2004) devem também ter contribuído para este resultado.

Mirza et al. (2001), relatam que o máximo aumento no crescimento das raízes e da parte aérea em cana-de-açúcar inoculada com *Enterobacter* foi obtido com um isolado que não apresentou a maior produção de AIA, e sim maior quantidade de N fixado.

Apesar do cálculo do N fixado, realizado segundo Galal et al. (2000), utilizando método não isotópico, pode não aferir somente a quantidade de N derivado da fixação

¹LOPES, E.S. Bio Soja. São Joaquim da Barra-SP. <<http://www.biosoja.com.br>>

biológica, pode-se observar que o maior incremento na quantidade de N acumulado com a inoculação em relação ao tratamento testemunha foi obtido na dose de 60 kg ha⁻¹ de N (Tabela 7), representando aproximadamente 20 a 30% do total do N absorvido pela planta.

Tabela 7 - N fixado no estágio de perfilhamento e maturidade fisiológica, em função de três doses de N, com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em relação ao tratamento testemunha

Tratamentos	Doses de N, kg ha ⁻¹		
	0	60	120
	N fixado, g m linear ⁻¹		
Perfilhamento			
IAC-AT-8(A)	0,12	0,75	0,52
IAC-HT-12(M)	0,21	0,41	0,17
IAC-HT-11(B)	-0,14	0,40	0,12
TEST	----	----	----
Maturidade (Folha+Colmo)			
IAC-AT-8(A)	-0,07	0,08	-0,11
IAC-HT-12(M)	0,02	0,11	-0,11
IAC-HT-11(B)	0,02	0,07	-0,01
TEST	----	----	----
Maturidade (Espiga)			
IAC-AT-8(A)	-0,15	0,37	-0,11
IAC-HT-12(M)	0,09	0,45	0,25
IAC-HT-11(B)	-0,08	0,37	0,018
TEST	----	----	----

Os dados deste trabalho sugerem fortemente que deve ter ocorrido fixação biológica do N₂, visto que na dose intermediária de N houve maior benefício da inoculação. Nesta dose de 60 kg ha⁻¹ de N não faltaria N para o início de um bom

desenvolvimento vegetal, e também, não ocorreria inibição da FBN por excesso de N disponível.

Também foi constatada uma correlação positiva da atividade da enzima redutase do nitrato com a produtividade de grãos ($r= 0,575$ $p<0,0001$), indicando que as bactérias podem ter auxiliado na absorção desse elemento do solo.

Assim, com a adição de quantidades moderadas de N aplicadas ao solo, a planta pôde beneficiar-se simultaneamente da FBN e da assimilação do N mineral.

5.3 Conclusões

- ✓ A cultura do trigo é beneficiada pela inoculação de diferentes gêneros e espécies de bactérias homólogas, obtidas por isolamento em meios de cultura específicos para diazotróficos associativos.
- ✓ A maior produção de grãos ocorre na presença das bactérias em níveis médios ou altos de adubação nitrogenada.
- ✓ A capacidade de produzir altas taxas de indóis “in vitro” não é necessariamente um pré-requisito para que ocorra aumento de crescimento e de produção em plantas inoculadas com BPCPs.
- ✓ Ficou demonstrado que a inoculação desses isolados de bactérias diazotróficas em trigo é economicamente viável nas doses intermediária e até alta de adubação nitrogenada, revertendo em lucro para o agricultor.

Referências

- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p. 35-46, 1986.
- BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DOBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.6, p.627-639, 1997.
- BASHAN, Y.; de-BASHAN, L.E. Plant growth-promoting. In: **Encyclopedia of soil in the environment**, HILLEL, D. ,Elsevier, Oxford, U.K., v. 1, p 103-115, 2005, 200p.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; de-BASHAN, L.E. Azospirillum plant-relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p.521-577, 2004.
- BHATTARAI, T.; HESS, D. Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp at various levels of N fertilization. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v.26, p.72-77, 1998.
- BERTRAND, H.; PLASSARD, C.; PINOCHET, X.; TOURAINE, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.) **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.46, p.229-236, 2000.
- BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. On nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.109-121, 1986.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.) **Methods of soil analysis** Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1149-1178.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Disponível em: http://www.conab.gov.br/download/comercializacao/precos_com/precos_2006/COMU_4_06.doc. Acesso em: 04 ago. de 2006.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, SPI.; Itaguaí: EMBRAPA, CNPAB, 1995. 60p.
- GALAL, Y.G.M.; EL-GHANDOUR, I.A.; ALY, S.S.; SOLIMAN, S.; GADALLA, A. Non-isotopic method for the quantification of biological nitrogen fixation and wheat production under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v.32, p.47-51, 2000.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.793-796, 1995.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular plant-microbe interactions**, St Paul, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

KALPULNIK, Y.; GAFNY, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* spp. Inoculation on root development and NO₃ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. **Canadian Journal of Botanic**, Ottawa, v.63, p. 627-631, 1983.

KAUSHIK, R.; SAXENA, A.K.; TILAK, K.V.B.R. Can *Azospirillum* strains capable of growing at a sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. **Biology and Fertility of Soils**, Mechelen, v.35, p.92-95, 2002.

LAMBRECHET, M., OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid : a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.8, p.298-300, 2000.

LIBBERT, E.; RISCH, H. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 22, p. 51-58, 1968.

LODEWYCKX, C.; VANGRONVELD, J.; PORTEUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; van der LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 21, p. 583-606, 2002.

MALIK, K.A.; BILAL, R.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MIRZA, M.S.; ALI, S. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 37-44, 1997.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 27-34, 2004

MARTIN, P.; GLATZLE, A.; KOLB, W.; Omay, H.; SCHMIDT, W. N₂ fixing bacteria in the rhizosphere: quantification and hormonal effects on root development. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v.152, p.237-245, 1989.

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.237, p. 47-54, 2001.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.3, p.223-228, 1985.

OMAY, S.H.; SCHIMIDT, W.A., MARTIN, P.; BANGERTH, F. Indolacetic acid production by rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p.187-192, 1993.

PILLET, P.E., CHOLLET, R. Sur le dosage colorimétric de l'acid indolylacétique. **CR Académie des Sciences**, Paris., v.271, p.1675-1678, 1970.

PRINSEN, E., COSTACURTA, A. , MICHIELS, K., VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: Evidence for a non- dependent pathway. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St Paul, v.6, p. 609-615, 1993.

RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Rehovot, v.32, p. 39-54, 2002.

_____. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p. 987-994,2004.

RAIJ, B.van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997. 285p. (IAC. Boletim n.100)

REED, A.J.; BELOW, F.E.; HAGEMAN, R.H. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and proteases activities during grain development in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.1179-1183, 1980.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O ; SELBACH, P.A, SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35 , p. 1201-1204, 2005.

SALA, V.M.R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 123p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo "Escola Superior de Agrigultura Luis de Queiroz", Piracicaba, 2002.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO. P.B.; SILVEIRA, A P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p. 345-352, 2005.

SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.245, p.215-222, 2002.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S. Yu.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I.
Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review.
Applied Biochemistry and Microbiology, Oxford, v.42, p. 117-126, 2006.

6 INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO DE *ACROMOBACTER INSOLITUS*, NOVO ENDÓFITO DE TRIGO, NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO.

Resumo

Este é o primeiro trabalho a relatar a influência da interação de plantas de trigo e isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Zoogloea* no metabolismo do nitrogênio. Foi realizado um experimento em casa de vegetação, utilizando-se solo não esterilizado e três níveis de adubação nitrogenada (0, 600 e 1200 mg) na forma de uréia. Os isolados utilizados, IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus* e IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*, foram marcados com resistência a antibióticos. Após 40 dias da inoculação todos os isolados empregados estavam presentes no interior das raízes, entretanto, não foram detectados no solo. Principalmente, o isolado bacteriano de *Achromobacter insolitus* influenciou o metabolismo do nitrogênio das plantas de trigo, propiciando maior atividade das enzimas redutase do nitrato e sintetase da glutamina, e maior teor de clorofila, resultando no aumento da eficiência de utilização N.

Termos para indexação: Redutase do nitrato, Sintetase da glutamina, Teor de clorofila.

Abstract

This study reports for the first time the interaction between wheat plants and homologous strains of endophytic diazotrophic bacteria from the genus *Achromobacter* and *Zoogloea* on the nitrogen metabolism. A greenhouse experiment was carried out on unsterilized soil and three levels of nitrogen fertilizer, given as urea. The strains IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus* e IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*, were selectively marked with antibiotic resistance. Forty days after inoculation, all three strains had been established in the interior of the roots, however, they could not be detected in the soil. The best results were obtained with *Achromobacter insolitus*, that influenced the N metabolism of the plants, increased the nitrate reductase and

glutamine synthetase activities, and the chlorophyll content, causing higher efficiency in N utilization.

Index terms: Nitrate reductase, Glutamine synthetase, Chlorophyll content.

6.1 Introdução

A utilização do nitrogênio atmosférico (N_2) está intimamente relacionada aos mecanismos de assimilação do nitrogênio pelas bactérias diazotróficas associativas e pela planta hospedeira (DONATO et al., 2004). Normalmente essas bactérias não conseguem substituir totalmente a adubação nitrogenada, como acontece com bactérias do gênero *Rhizobium* para a cultura da soja. Espera-se que, com a aplicação de quantidades moderadas de N ao solo, a planta pode beneficiar-se simultaneamente da fixação biológica do N_2 (FBN) e da assimilação do N mineral. Parece evidente que múltiplos mecanismos estão interagindo para obtenção dos benefícios propiciados às plantas às quais estas bactérias estão associadas. Assim, os trabalhos realizados com a finalidade de estudar os mecanismos da interação entre bactérias diazotróficas endofíticas e as enzimas do metabolismo das plantas podem ser uma importante ferramenta para auxiliar na seleção de bactérias eficientes na FBN e também, na absorção e no aproveitamento do N disponível.

A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a fitomassa e a produtividade final das culturas. Nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) são as formas preferencialmente absorvidas pelas plantas. Normalmente, a forma predominante nos solos é o nitrato, o qual é convertido à amônia, sendo que esse processo é mediado pela redutase do nitrato, que reduz nitrato a nitrito, e pela redutase do nitrito, que converte nitrito à amônia. A amônia é então assimilada nos aminoácidos glutamina e glutamato, pela ação das enzimas sintetase da glutamina (SG) e sintetase do glutamato (GOGAT), os quais servem para translocar nitrogênio orgânico de fontes para drenos (FERREIRA et al., 2002).

As bactérias diazotróficas endofíticas são favorecidas porque o interior da planta representa um hábitat mais protegido de outros microrganismos, além do maior acesso

aos nutrientes disponibilizados pelas plantas. Entretanto, em condições de campo, a multiplicação e o estabelecimento na rizosfera são fatores importantes para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas, uma vez que precisam competir com os microrganismos nativos já existentes no solo (BALDANI et al., 1986).

Assim, os objetivos desse trabalho foram observar a capacidade de colonização de isolados homólogos e avaliar a influência da inoculação no metabolismo do nitrogênio de plantas de trigo.

6.2 Desenvolvimento

6.2.1 Material e métodos

Os isolados utilizados: IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense* (acesso no Genbank nº DQ386149), IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus* (acesso no Genbank nº DQ386150), IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera* (acesso no Genbank nº DQ389143); foram obtidos de raízes de plantas de trigo desinfetadas superficialmente (SALA et al., 2005).

Os isolados acima mencionados foram marcados com resistência a diferentes antibióticos. IAC-AT-8: neomicina 100 µg mL⁻¹ e estreptomicina 50 µg mL⁻¹, IAC-HT-11: 100 µg mL⁻¹ estreptomicina, cloranfenicol e neomicina, IAC-HT-12: 100 µg mL⁻¹ estreptomicina e cloranfenicol.

Foram utilizados vasos de 5 litros contendo solo não esterilizado, com as seguintes características de fertilidade (profundidade 0-20 cm): NH₄ 12,37 e NO₃ 3,93 mg kg⁻¹, MO 41 g dm³, pH em CaCl₂ 5,4, P 76 mg dm³, K 5,3, Ca 44, Mg 16, H+Al 31, S.B. 65,3, C.T.C 96 mmolc dm³, V% 68, B 0,29, Cu 6, Fe 14, Mn 57 e Zn 4,3 mg dm³. Foram semeadas 9 sementes de trigo por vaso, do genótipo IAC-370 (*Triticum aestivum hard* L.), após a germinação foi realizado o desbaste deixando 3 plantas por vaso.

Os isolados foram repicados para meio de cultura líquido acrescido de nitrogênio, sendo esses: NFb (IAC-AT-8) e JNFb (IAC-HT-11 e IAC-HT-12) (Döbereiner et al., 1995). As culturas cresceram sob agitação constante durante 24 horas. A inoculação das bactérias foi realizada após o desbaste das plantas, sendo utilizado 5 mL por vaso, com 10 repetições. As plantas testemunhas receberam inóculo autoclavado. Foram

utilizados 3 níveis de adubação nitrogenada, 0 mg N/vaso, 600 mg N/vaso, 1200 mg N/vaso na forma de uréia, os quais foram parcelados em 3 aplicações, sendo 20% no plantio, 40% aos 15 dias e 40% aos 30 dias. O experimento foi mantido por 70 dias.

Após 40 dias da inoculação foram realizadas as seguintes análises:

6.2.1.1 Análise da colonização pela contagem do número de bactérias no solo e nas raízes.

A quantificação das bactérias foi realizada segundo Döbereiner et al. (1995). As raízes foram desinfetadas superficialmente com solução de cloramina-T a 1% e trituradas com solução de sacarose a 4%, a seguir, foram feitas diluições seriadas das amostras, de solo ou de raízes, em solução de sacarose, de 10^{-2} a 10^{-7} .

A contagem foi feita em meio semi-sólido sem nitrogênio NFb (IAC-AT-8) e JNFb (IAC-HT-11 e IAC-HT-12), nos quais os isolados foram originalmente obtidos, com a adição dos respectivos antibióticos utilizados na marcação das estirpes. Foram utilizados 5 frascos por diluição, avaliando-se através do método do número mais provável, baseado na presença ou ausência de película formada após 7 dias de incubação a 28°C.

Para determinação da atividade das enzimas e do teor de clorofila, foram coletadas as folhas mais novas completamente expandidas. A coleta foi realizada entre 9:00 e 10:00 h da manhã.

6.2.1.2 Atividade da enzima redutase do nitrato

O método colorimétrico para estimar a atividade da redutase do nitrato “in vivo” consiste em infiltrar o tecido vegetal em uma solução contendo nitrato, possibilitando a quantificação de nitrito produzido na reação que se difunde para o meio de infiltração (REED et al., 1980). Foram utilizados 200 mg de discos foliares com 5 mL de substrato tamponado (200 mM KNO_3 em tampão fosfato 50 mM pH 7,5) acrescido de 0,5% de Tween-20. Os tubos de ensaio com tampas de rosca semi-abertas, foram submetidos a

vácuo 3 vezes por 2 minutos. A seguir, os tubos vedados foram incubados por 1 h a 37 °C, no escuro. Após a filtração, foi tomada uma alíquota de 1 mL e a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 2 N e 1 mL de α -naftilenodiamino 0,05%. Após 5 minutos foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm.

6.2.1.3 Atividade da enzima sintetase da glutamina

A atividade da enzima sintetase da glutamina pode ser avaliada pela formação de γ -glutamilhidroximato a partir de glutamato e hidroxilamina, a qual substitui a amônia (RHODES et al., 1975). Foi utilizado 1 g de tecido vegetal anteriormente macerado com nitrogênio líquido, adicionando 2 mL de tampão de extração (0,05M de Tris-HCl, 1mM EDTA-NO₂ e 0,2 mL/L de mercaptoetanol, pH 7,5) e centrifugado a 15000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. Foram adicionados a 300 μ L do sobrenadante das amostras, 0,5 mL de Tris-HCl 200mM pH 7,5, 0,1 mL de cisteína 100mM, 0,5 mL de glutamato de sódio 500mM, 0,3 mL de hidroxilamina 100mM, 0,2 mL de ATP 50mM e incubado a 30°C por 30 minutos. A reação foi paralisada adicionando-se 2 mL de reagente contendo cloreto férrico (10% FeCl₃, 24% de ácido tricloroacético e HCl 6N, na proporção 1:1:1). A proteína precipitada foi removida por centrifugação (10 minutos, 3000 rpm). Foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm.

6.2.1.4 Análise do teor de clorofila

A análise do teor de clorofila foi realizada utilizando-se dimetilsulfóxido como extrator de pigmentos. Foi utilizado 0,05 g de tecido vegetal e adicionado 7 mL de dimetilsulfóxido, incubado a 65°C por 30 minutos, em tubos vedados e mantidos no escuro. No cálculo da clorofila foram utilizadas as equações propostas por Arnon (1949):

$\text{Chl a} = [0,0127 \times (663\text{nm}) + 0,00269 \times (645\text{nm})]$ e $\text{Chl b} = [0,0229 \times (645\text{nm}) + 0,00468 \times (663\text{nm})]$.

Os resultados são expressos em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de extrato.

Após 70 dias, as plantas foram coletadas para análise da produção de massa de matéria seca da parte aérea, para determinação da concentração de N pelo método micro-Kjeldahl (BREMNER, 1965) e para análise da massa de matéria fresca das raízes.

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente pelo programa Sanest, sendo utilizado o teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha, e regressões polinomiais para comparação entre as doses de N utilizadas.

6.2.2 Resultados e discussão

6.2.2.1 Quantificação de bactérias diazotróficas

A marcação das estirpes utilizando mutantes resistentes a antibióticos demonstrou ser uma ferramenta simples e efetiva para avaliar a colonização das bactérias nas raízes de plantas de trigo, uma vez que, não houve crescimento nos meios de cultivo com a adição dos antibióticos empregados quando foram utilizadas raízes das plantas que não receberam inóculo.

Não houve diferença na quantificação das bactérias nas raízes, independentemente do isolado inoculado na planta, apresentando uma colonização de aproximadamente 10^5 g raiz⁻¹. Entretanto, quando foram utilizadas diluições de solo não foi possível realizar a quantificação da colonização, uma vez que não houve crescimento nos meios de cultivo empregados, comprovando o caráter endofítico dos isolados utilizados.

Tem sido demonstrado que estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecerem nas raízes quando inoculadas na mesma espécie vegetal (homólogas) e estudos de inoculação em cereais, confirmaram que o genótipo da planta influencia na associação planta-bactéria (BALDANI; BALDANI, 2005). Os isolados empregados no presente trabalho são homólogos, porém, foram isolados de outro genótipo de trigo (SALA et al., 2005). Apesar disso, foram capazes de colonizar as raízes do genótipo IAC-370, não demonstrando especificidade genotípica.

6.2.2.2 Metabolismo do nitrogênio

Foi utilizada uréia como fertilizante nitrogenado, a qual gera amônia para as plantas, entretanto, somente na ausência de N adicionado não houve efeito da inoculação na atividade da enzima redutase do nitrato (RN). Porém, quando foi adicionado N, a maior atividade da RN na planta foi observada com o emprego do isolado IAC-HT-11. Observou-se que todos os tratamentos tiveram um ajuste quadrático em relação às doses de N utilizadas (Figura 21A).

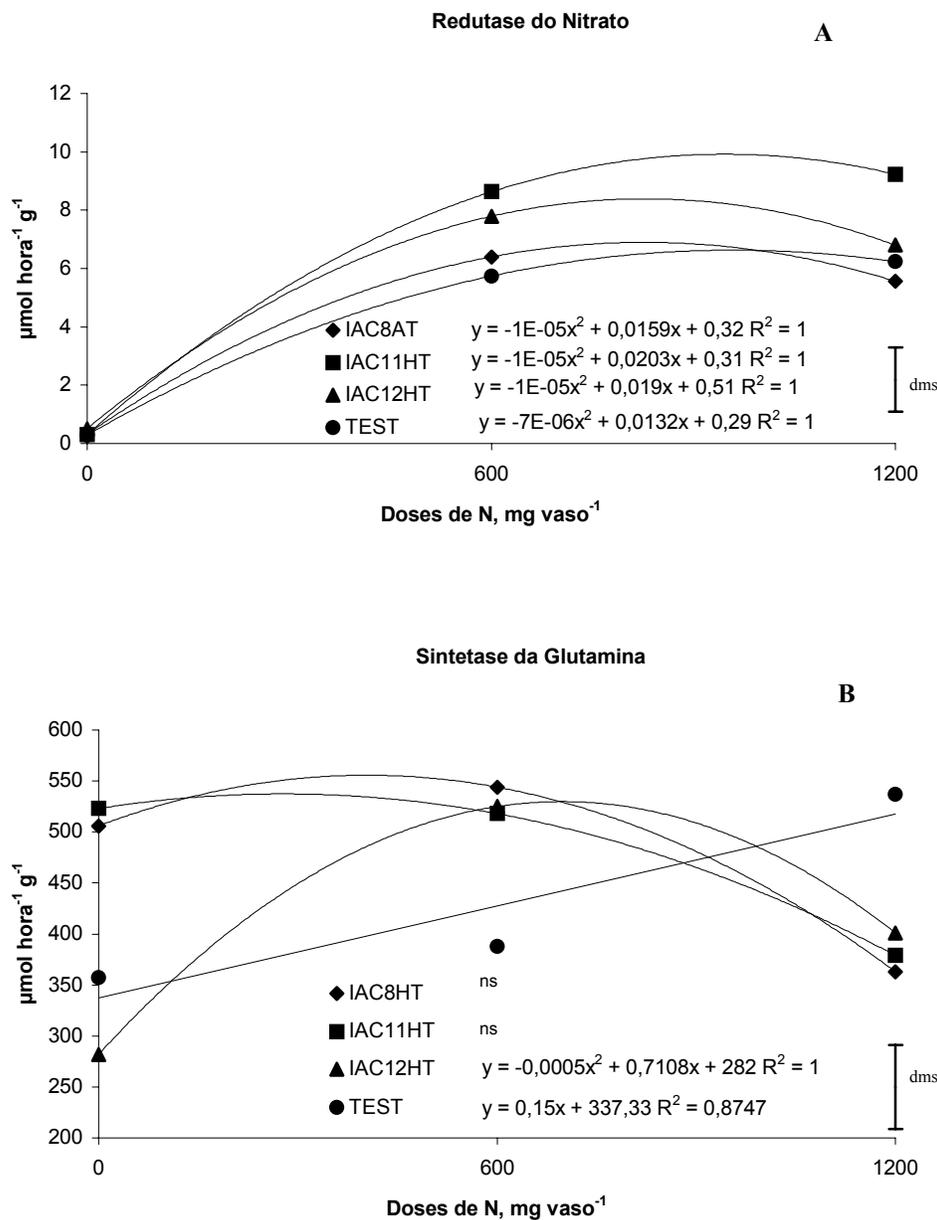


Figura 21 - Atividade da enzima redutase do nitrato (A) e sintetase da glutamina (B) nas folhas, em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N

Andrews et al. (1990) demonstraram a atividade da redutase do nitrato constitutiva, ou seja, na ausência de nitrato, em várias espécies de plantas que podem obter N pela fixação biológica, como a soja e o feijão. Também, Donato et al. (2004), sugerem que o aumento na atividade dessa enzima em plantas de cana-de-açúcar, na ausência de nitrato, possa estar relacionado à presença de bactérias fixadoras de N pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*. Ainda, deve ser considerado que o solo já continha nitrato, sendo maior a taxa de mineralização da matéria orgânica devido ao estímulo da microbiota quando a planta estava melhor nutrida.

Não existem trabalhos estudando as enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio em plantas infectadas por bactérias do gênero *Achromobacter*, entretanto há vários relatos com *Azospirillum*. Boddey et al. (1986), utilizando mutantes RN⁻ observaram que os benefícios em plantas de trigo propiciados por uma estirpe de *Azospirillum* não eram devido à FBN, mas pela maior absorção de N do solo, devido ao aumento na atividade da RN. Também, EL-Khomy et al. (2003) utilizando mutantes RN⁻ de *Azospirillum*, observaram que estirpes RN⁺ eram mais eficientes em proporcionar aumento do N acumulado em plantas de trigo.

A inoculação dos isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-11 propiciou aumento da atividade da enzima sintetase da glutamina na ausência de N adicionado (Figura 21B). Uma hipótese seria atribuir esse efeito à FBN, a qual disponibilizaria maior quantidade de amônia para a planta, quando associada a essas bactérias. Além disso, como foi utilizado solo como substrato, o qual já continha N em sua composição, na forma amoniacal, pode-se intervir que as plantas na presença dos isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-11 foram capazes absorver maior quantidade de íons do solo e conseqüentemente obter mais N. Bertrand et al. (2000) demonstraram que plantas de canola associadas a bactérias do gênero *Achromobacter* apresentavam aumento no sistema de transporte de íons pelas raízes. Os autores também sugerem que o aumento na absorção de íons pode ser devido a modificações na demanda nutricional da planta quando associada à bactéria. Também, esse efeito no transporte de íons, já foi demonstrado em plantas de trigo associadas a bactérias do gênero *Azospirillum* (AMOOAGHAIE et al., 2002). Além disso, todos os isolados empregados promoveram o aumento na atividade dessa enzima quando utilizada uma dose intermediária de N (Figura 21B).

Pode-se observar que houve uma menor atividade da SG na maior dose de N (N2) na presença dos isolados empregados em relação ao tratamento testemunha, e também quando comparada com a dose intermediária utilizada (N1), o que possivelmente, poderia ser atribuído a uma maior assimilação da amônia nas raízes, diminuindo sua disponibilidade na parte aérea das plantas, ou ainda, as plantas já supridas em nitrogênio com a inoculação, na maior dose utilizada, não tiveram mais necessidade de assimilação desse elemento, levando a diminuição na atividade da SG.

O teor de clorofila foliar representa uma variável confiável para estimar a aquisição de N pelas plantas, sendo geralmente, correlacionado com a atividade da enzima redutase do nitrato ($r=0,663$ $p<0,0001$), a qual utiliza o poder redutor gerado pelo processo fotossintético. Entretanto, o teor de clorofila foi influenciado pela inoculação independentemente da dose de N adicionada, sendo que, somente as plantas na presença do isolado IAC-HT-11 apresentaram significativamente maior teor de clorofila que as plantas testemunha (Figura 22).

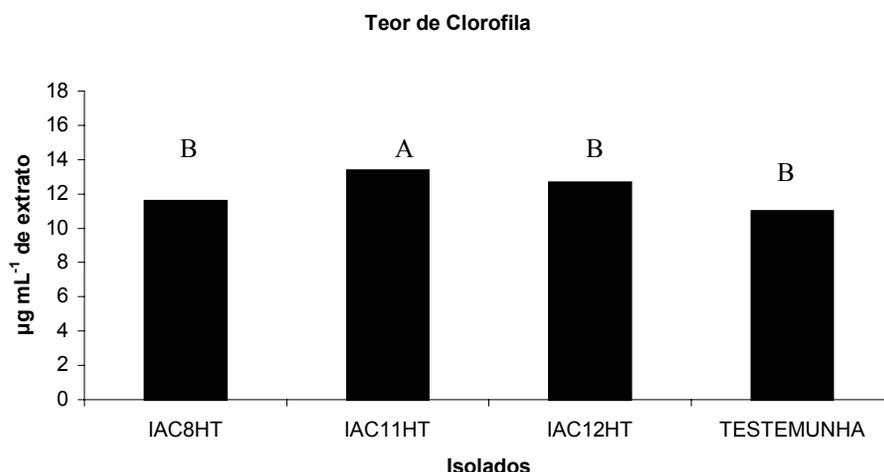


Figura 22 - Teor de clorofila foliar sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Pode-se observar que, principalmente, o emprego do isolado IAC-HT-11 influenciou o metabolismo do nitrogênio das plantas, considerando-se a média, ou seja ,

excluindo-se o fator doses de N. Houve maior atividade das enzimas redutase do nitrato e sintetase da glutamina, e maior teor de clorofila do que nas plantas testemunha.

6.2.2.3 Crescimento da planta

A inoculação promoveu o aumento do N acumulado nas folhas e nos colmos na maior dose de N utilizada, apresentando um ajuste linear ascendente, enquanto que as plantas do tratamento testemunha tiveram um ajuste quadrático em relação às doses N (Figura 23A). Também, somente houve aumento no N acumulado nas espigas na dose de 1200 mg de N, sendo que, os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-12 superaram significativamente o tratamento testemunha (Figura 23B).

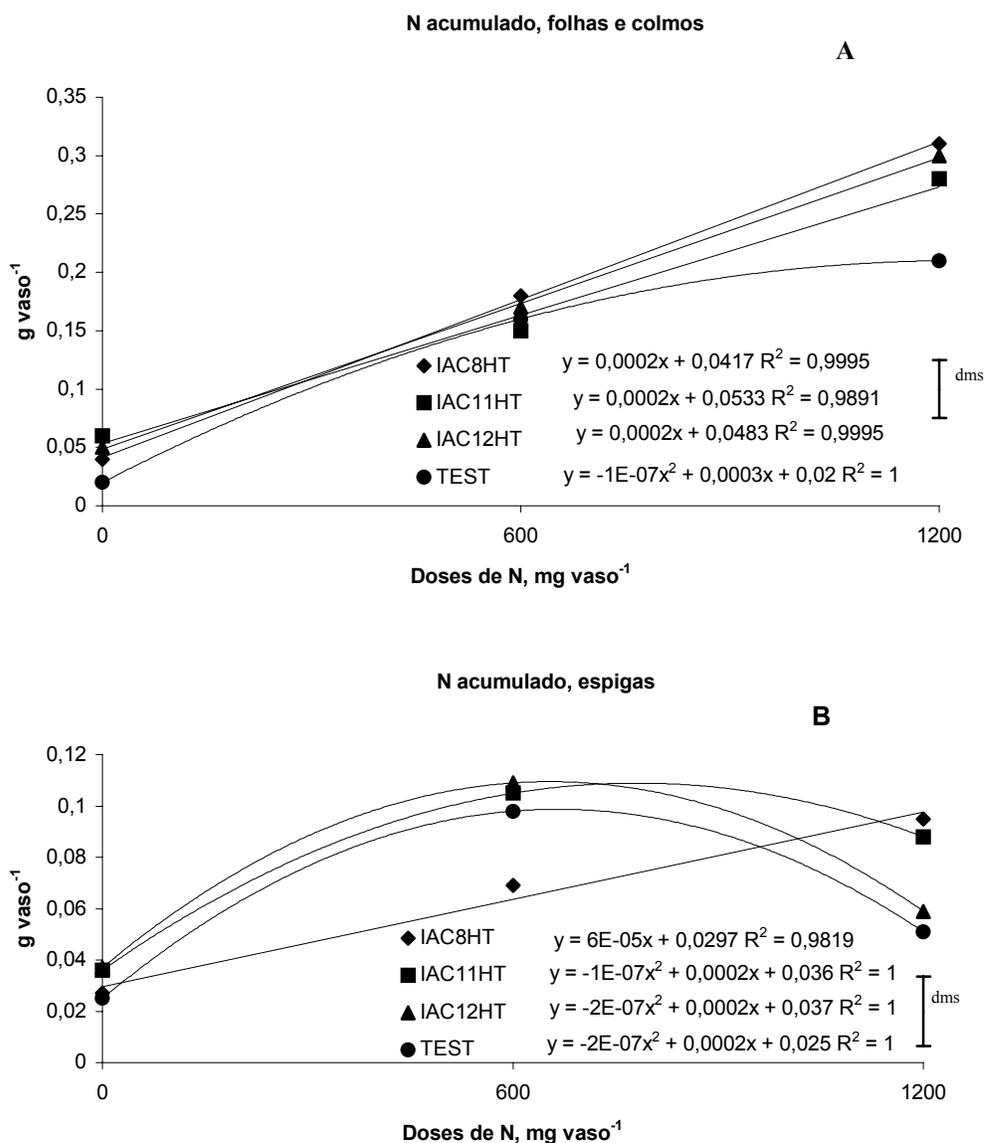


Figura 23 - Quantidade acumulada de N nas folhas e colmos (A), e nas espigas (B) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (♦), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N

O isolado IAC-HT-11 propiciou o aumento no índice de eficiência de utilização (IEU) do N, na ausência de N adicional e na dose intermediária utilizada, tanto nas folhas e nos colmos (Figura 24A), assim como nas espigas (Figura 24B).

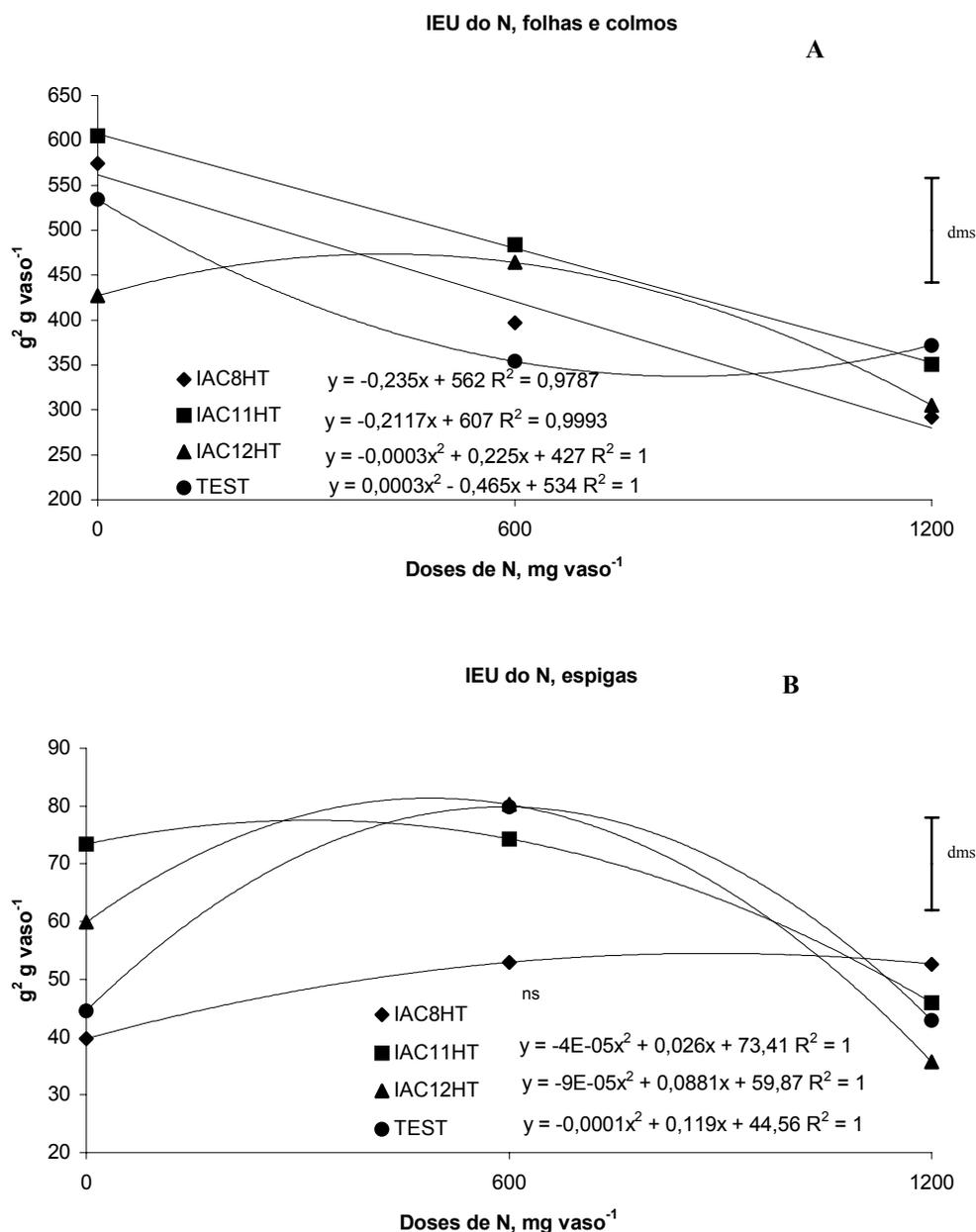


Figura 24 - Índice de eficiência de utilização do N nas folhas e nos colmos (A), e nas espigas (B) em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N

A inoculação promoveu o aumento da biomassa das folhas e colmos (Figura 25), independentemente da dose de N empregada.

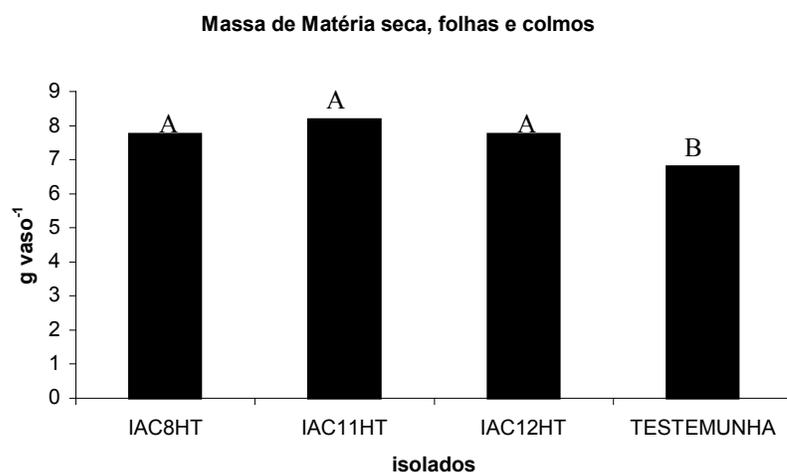


Figura 25 - Massa de matéria seca das folhas e colmos sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Entretanto, somente o isolado IAC-AT-8 promoveu o aumento da massa seca das espigas na maior dose de N utilizada, observando-se um ajuste linear ascendente, enquanto os demais tratamentos apresentaram um ajuste quadrático em relação às doses de N empregadas (Figura 26).

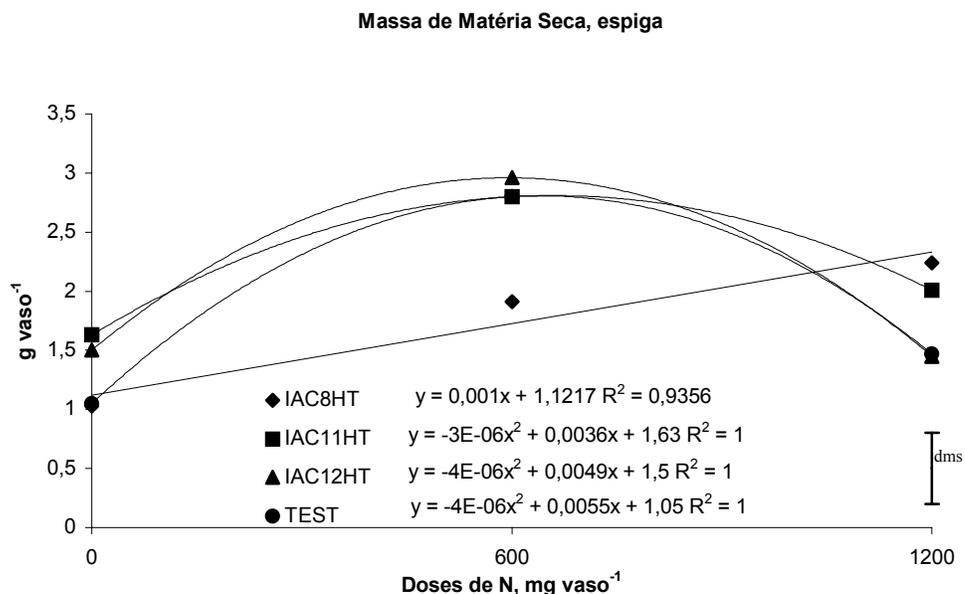


Figura 26 - Massa de matéria seca das espigas em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N.

Houve aumento da massa das raízes com a inoculação, em todas as doses de N empregadas (Figura 27). Já foi observado que os isolados utilizados promovem aumento no crescimento das raízes de plantas de trigo em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005), sendo que o efeito estimulatório no desenvolvimento das raízes nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta pode ser responsável pelo efeito positivo da inoculação (MERTENS; HESS, 1984).

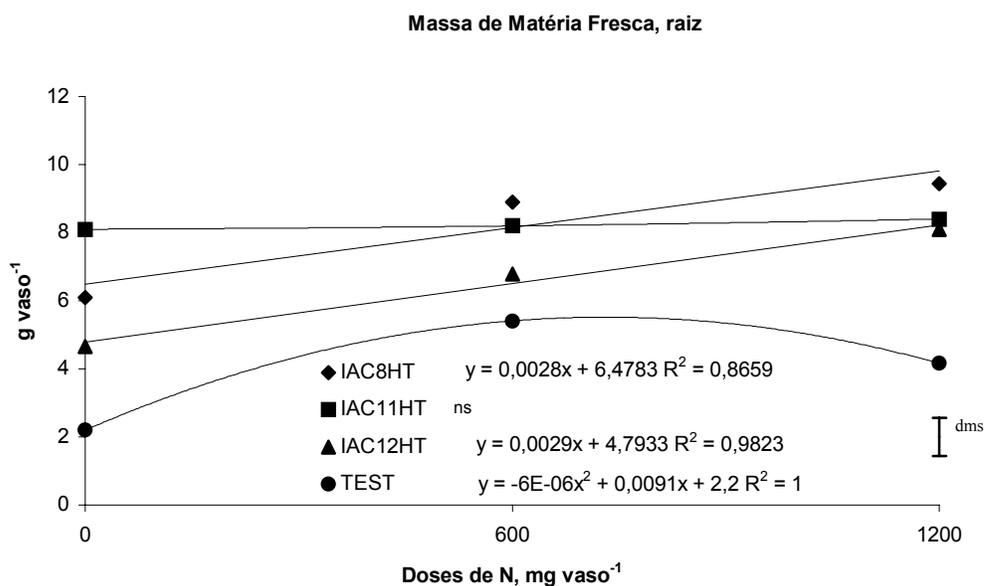


Figura 27 - Massa de matéria fresca da raiz em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (◆), IAC-HT-11 (■), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). dms- diferença mínima significativa pelo teste de Tukey a 5% para comparação entre os isolados e a testemunha em uma mesma dose de N

Também, Roesch et al. (2005) observaram que a inoculação de isolados homólogos de bactérias diazotróficas em plantas promoveu aumento no crescimento das raízes. Pode-se observar uma maior quantidade de raízes laterais na presença dos isolados empregados (Figura 28).

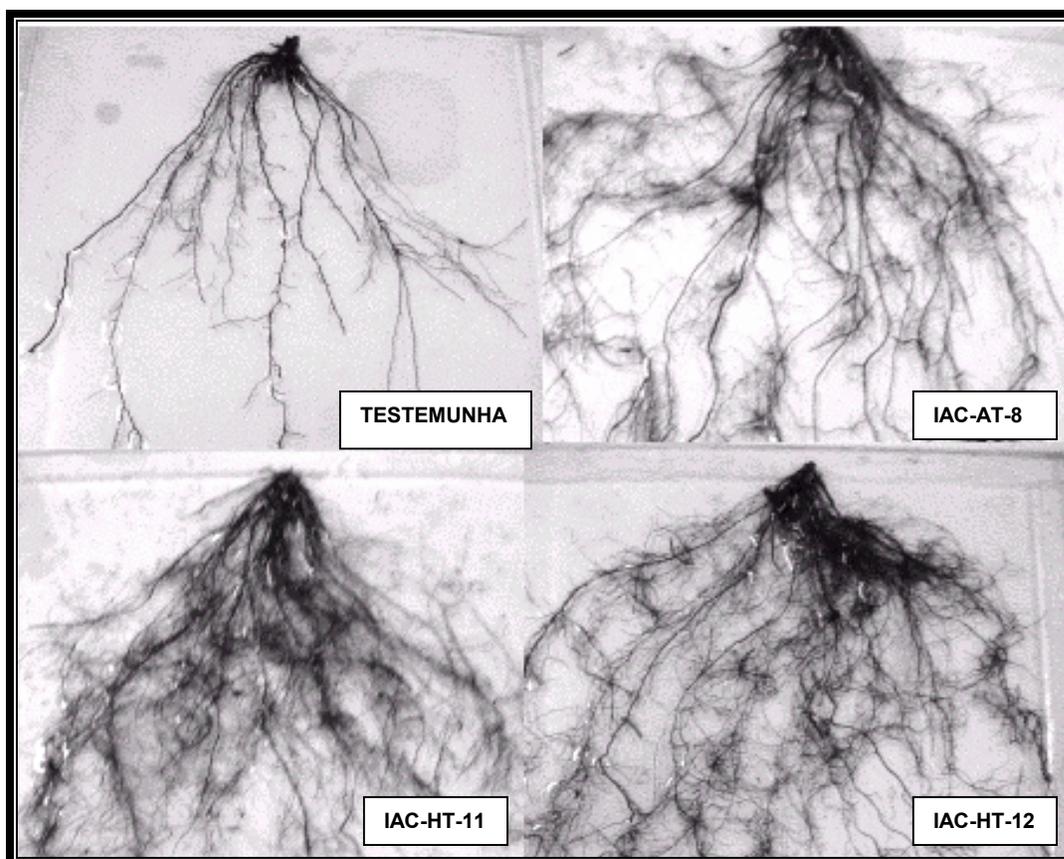


Figura 28. Raízes de trigo sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação

Segundo Mantelin e Touraine (2004), a absorção de nitrogênio e a estrutura das raízes das plantas são influenciadas por bactérias promotoras de crescimento (BPCP), assim como pela disponibilidade de nitrogênio do ambiente. O efeito propiciado por BPCPs na absorção de nitrogênio e no desenvolvimento das raízes é similar ao observado em situação de baixa disponibilidade de N, ou seja, aumento do desenvolvimento de raízes laterais e estimulação da absorção de N.

Vários trabalhos sugerem que bactérias diazotróficas isoladas de plantas não leguminosas não substituem a adubação nitrogenada (OKON, 1985; SAUBIDET et al., 2002), porém, promovem melhor absorção e utilização do N disponível. Os efeitos benéficos propiciados pela inoculação do isolado IAC-HT-11 de *Achromobacter insolitus* sugere que, provavelmente, vários mecanismos possam estar atuando em conjunto, interferindo no metabolismo do nitrogênio e conseqüentemente no crescimento das plantas.

6.3 Conclusões

- ✓ Os isolados bacterianos utilizados: IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera* podem colonizar, como endófitos, as raízes de plantas de trigo do genótipo IAC-370.
- ✓ O isolado IAC-HT-11 de *Achromobacter insolitus*, influenciou o metabolismo do nitrogênio, propiciando o aumento no IEU do N das plantas na ausência de N adicional e na dose intermediária de N.

Referências

- AMOOAGHAIE, R.; MOSTAJERAN, A.; EMTIAZI, G. The effect of compatible and incompatible *Azospirillum brasilense* strains on proton efflux of intact wheat roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.243, p.155–160, 2002.
- ANDREWS, M.; FARIA, S.M.; McINROY, S.G.; SPRENT, J.I. Constitutive nitrate reductase activity in the leguminosae. **Phytochemistry**, London, v.29, p.49-54, 1990.
- ARNON, D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.24, p.1-15, 1949.
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p. 35-46, 1986.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.77, p.549-579, 2005.
- BERTRAND, H.; PLASSARD, C.; PINOCHET, X.; TOURAINE, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.46, p.229-236, 2000.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.) **Methods of soil analysis** Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1149-1178.
- BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. On nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.109-121, 1986.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, SPI.; Itaguaí: EMBRAPA, CNPAB, 1995. 60p.
- DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, E.S.; FRANÇA, J.G.E.; MACIEL, G.A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p. 1087-1093, 2004
- EL-KOMY, H.M.; HANDIA, M.A.; Abd EL-BAKI, G.K. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.46, p.281-287, 2004.

- FERREIRA, V.M.; MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.ºM.; OLIVEIRA, L.E.M.; PURCINO, A.A.C. Metabolismo de nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.13-17, 2002.
- MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 27-34, 2004.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potencial inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.3, p.223-228, 1985.
- REED, A.J.; BELOW, F.E.; HAGEMAN, R.H. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and proteases activities during grain development in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.1179-1183, 1980.
- RHODES, D.; RENDON, G.A.; STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. **Planta**, New York, v.125, p.201-211, 1975.
- ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O ; SELBACH, P.A, SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35 , p. 1201-1204, 2005.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO. P.B.; SILVEIRA, A P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p. 345-352, 2005.
- SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX. The effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.245, p.215-222, 2002.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados bacterianos utilizados nesse trabalho foram obtidos de raízes de trigo do genótipo ITD-19 (*Triticum durum*), desinfetadas superficialmente. Entretanto, no presente trabalho, o genótipo IAC370 foi incluído devido a suas características promissoras, sendo ultimamente utilizado intensivamente pelos agricultores. Porém, o genótipo ITD 19 não foi excluído dos experimentos devido à hipótese de uma possível especificidade genotípica, como amplamente relatado em trabalhos anteriores.

Entretanto, pode-se concluir, com base na resposta à inoculação obtida em três experimentos de campo, que os isolados utilizados não apresentaram especificidade ao nível de genótipo. Ainda, os maiores aumentos na produtividade devido à inoculação, foram obtidos nas plantas do genótipo IAC-370 em todos os três experimentos realizados, comparado ao genótipo ITD-19.

Assim, o genótipo IAC370 foi selecionado para o experimento realizado no ano de 2005, sendo confirmado, novamente, o efeito benéfico da inoculação nas plantas pertencentes a esse genótipo (Tabela 6).

Apesar da contagem do número de bactérias realizada em experimento em casa de vegetação não ter mostrado diferença na quantificação da colonização entre os isolados empregados, talvez devido a condições mais controladas que esse ambiente proporciona em relação a condições de campo, pode-se observar que o isolado IAC-HT-11 apresentou maior resistência a antibióticos que os demais isolados (Cap. 6, item 6.2.1). Essa característica poderia representar uma vantagem em condições de campo, uma vez que a bactéria precisa competir com outros microrganismos nativos.

A observação da colonização utilizando microscopia eletrônica, demonstrou que este isolado estava em menor número na parte externa das raízes (Figuras 4 e 5), comparado aos demais isolados, porém, colonizou intensamente, como endófito, a região interna das raízes, o que pode conferir vantagens ecológicas sobre as bactérias que somente são capazes de colonizar a parte externa das raízes, uma vez que têm acesso a um ambiente mais uniforme e protegido das condições externas.

Os resultados positivos obtidos com o isolado IAC-HT-11, na presença de adubo nitrogenado adicionado, sugerem que outros mecanismos, que não a FBN, possam ser

co-responsáveis pelos efeitos benéficos propiciados. Ainda, pode ter ocorrido uma seleção natural e/ou uma adaptação na associação planta-bactéria diazotrófica, uma vez que os isolados utilizados foram obtidos de plantas de trigo na presença de adubação nitrogenada (SALA et al., 2005). Uma hipótese seria que esse isolado adquiriu a característica de manter o nível da FBN mesmo na presença de altos níveis de N.

Já foi observado que os isolados empregados promovem aumento no crescimento das raízes de plantas de trigo em condições gnotobióticas (SALA et al., 2005), sendo que este efeito também foi demonstrado no presente trabalho utilizando amostra de solo não esterilizado como substrato (Figura 27), e ainda, pode-se observar que este efeito foi principalmente devido ao aumento no número de raízes laterais (Figura 28).

A capacidade de produzir altas taxas de indóis “in vitro” não é necessariamente um pré-requisito para que ocorra aumento de crescimento e de produção em plantas inoculadas com BPCPs, pois o efeito benéfico depende de sua concentração. Os fitormônios estimulam o crescimento das raízes em baixas concentrações, porém, causam efeito inibitório em altas concentrações (DOBBELAERE et al., 2002). Esse efeito pode ser responsável pela resposta obtida com o emprego do isolado IAC-HT-11 de *Achromobacter insolitus*, o qual promoveu os maiores benefícios à cultura do trigo e apresentou a menor capacidade de síntese de indóis em cultura pura de células (Tabelas 4 e 5).

Existem poucos relatos dos efeitos propiciados pela inoculação de bactérias pertencentes ao gênero *Achromobacter* em plantas. Possivelmente, múltiplos mecanismos podem estar atuando em conjunto ou isoladamente para obtenção do aumento da produção de grãos com o emprego do isolado IAC-HT-11, como o aumento da atividade das enzimas redutase do nitrato e sintetase da glutamina (Figura 21), que pode ser devido a maior quantidade de substrato obtido com o aumento do fluxo de íons das raízes com a solução do solo, conjuntamente com o aumento das raízes laterais (Figura 28), e conseqüentemente, a exploração de um maior volume de solo.

Na prática, somente o grão tem valor econômico para a cultura do trigo, sendo o parâmetro mais importante para determinar a viabilidade econômica da inoculação.

Apesar de muitos anos de pesquisa com bactérias diazotróficas associativas em cereias, ainda se observam respostas muito variáveis, ou seja, falta de reprodutibilidade dos resultados, o que tem limitado a produção de um inoculante comercial. Embora não tenha ficado claro qual mecanismo ou mecanismos são responsáveis pela resposta positiva da inoculação, o isolado IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*, um novo endófito de trigo, propiciou aumento da produção de grãos em todos os experimentos realizados, sendo que esses aumentos foram obtidos na presença de adubo nitrogenado adicionado.

Entretanto, ficou demonstrado que a inoculação é economicamente viável nas doses intermediária e até alta de adubação nitrogenada, revertendo em lucro para o agricultor, uma vez que, a inoculação pode ser considerada uma prática pouco onerosa para a cultura, sendo obtidos lucros com a inoculação do isolado IAC-HT-11 mesmo na maior dose de N utilizada, os quais variaram de R\$87,00 a R\$200,00 ha⁻¹, e no experimento realizado no ano de 2005, esse isolado proporcionou lucro de R\$ 270,00 ha⁻¹, na dose de 60 kg ha⁻¹ de N. De acordo com Bashand e Levanony (1990), aumentos moderados, em torno de 20%, como constatado no presente trabalho, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, poderiam ser considerados comercialmente significativos na agricultura moderna, desde que consistentes. Portanto, a prática da inoculação de sementes de trigo com este isolado deve ser recomendada, por mostrar-se muito promissora.

Além disso, ressalta-se que esse é o primeiro relato da presença de bactérias pertencentes aos gêneros *Achromobacter* e *Zoogloea* como endófitas de plantas de trigo, e do efeito de sua inoculação em condições de campo.

Anexos

Tabela 1 - Massa de matéria seca da parte aérea e N acumulado de dois genótipos de trigo, no estágio de perfilhamento, do experimento de campo instalado em Campinas, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas.

Tratamentos		Doses de N, kg ha ⁻¹					
		0		60		120	
		Massa de matéria seca, g m linear ⁻¹			N acumulado, g m linear ⁻¹		
Perfilhamento							
IAC-370	8AT	97,03AB	127,83A	109,42A	1,290A	1,831A*	1,705A
	11HT	94,31AB	136,77A	116,84A	1,210A	1,784A	1,697A
	12HT	79,73B	144,08A	107,18A	1,013A	1,867A	1,857A
	TEST	115,26A*	94,07B	102,33A	1,420A	1,521A	1,673A
ITD-19	8AT	117,20AB	105,18B	160,81A*	1,479AB	1,366B	2,898A*
	11HT	96,84BC	115,31B	104,68B	1,326BC	1,692AB	1,870B
	12HT	130,20A*	149,10A	162,62A*	1,782A*	2,090A	2,508A*
	TEST	77,88C	87,68B	118,58B	1,024C	1,319B	1,870B

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical, dentro de cada genótipo, e asteriscos são para comparação entre genótipos dentro do mesmo tratamento

Tabela 2 - Massa da matéria seca da parte aérea e N acumulado de dois genótipos de trigo, no estágio de perfilhamento, do experimento de campo instalado em Mococa, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas

Tratamentos		Doses de N, kg ha ⁻¹						
		0			60			120
		Massa de matéria seca, g m linear ⁻¹			N acumulado, g m linear ⁻¹			
IAC-370	8AT	58,83AB	135,46B*	143,05B	0,771A	1,819AB*	2,453B	
	11HT	46,41B	129,68B	159,99AB*	0,659A	1,649B	2,957A	
	12HT	61,95AB	159,65A*	174,06A	0,788A	2,066A*	3,034A	
	TEST	72,70A	129,85B	138,57B	0,900A	1,676AB*	2,166B	
ITD-19	8AT	44,02B	105,74B	143,69AB	0,481B	1,383AB	2,414A	
	11HT	50,49B	130,51A	129,45B	0,591B	1,757A	2,256A	
	12HT	45,28B	102,89B	156,35A	0,590B	1,519AB	2,622A	
	TEST	81,59A*	101,86B	145,18AB	1,074A	1,252B	2,348A	

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical, dentro de cada genótipo, e asteriscos são para comparação entre genótipos dentro do mesmo tratamento

Tabela 3 - Produtividade de dois genótipos de trigo, no estágio de quatro folhas e de perfilhamento, do experimento de campo instalado em Campinas, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas

Tratamentos	Doses de N, kg ha ⁻¹		
	0	60	120
	Produtividade, kg ha ⁻¹		
IAC-370 8AT	2024B	3633A	3905B
11HT	2267B	2916B	2885C
12HT	3450A*	3564A	4518A*
TEST	2385B	3292AB	3565B
ITD-19 8AT	2431B	3606A	3538B
11HT	3227A*	3538A*	4195A*
12HT	2609B	3897A	3825AB
TEST	3230A*	3822A	3823AB

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical, dentro de cada genótipo, e asteriscos são para comparação entre genótipos dentro do mesmo tratamento

Tabela 4. - Produtividade de dois genótipos de trigo, do experimento de campo instalado em Mococa, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas

Tratamentos		Doses de N, kg ha ⁻¹		
		0	60	120
		Produtividade, Kg ha ⁻¹		
IAC-370	8AT	1004A	2085B	2639A
	11HT	941A	2277AB	2746A*
	12HT	1012A	2264AB*	2554AB*
	TEST	1033A	2530A	2209B
ITD-19	8AT	1025A	2325A	2508A
	11HT	1023A	2253A	2068B
	12HT	919A	1679B	2042B
	TEST	1119A	1940AB	2204AB

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical, dentro de cada genótipo, e asteriscos são para comparação entre genótipos dentro do mesmo tratamento

Tabela 5 - Massa de matéria seca da parte aérea de dois genótipos de trigo, no estágio de perfilhamento, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas

Tratamentos		Doses de N, kg ha ⁻¹		
		0	60	120
Massa de matéria seca, g m linear ⁻¹				
IAC-370	IAC-AT-8	90,07B	170,33A	143,56A
	IAC-HT-11	100,85AB	111,74B	146,16A
	IAC-HT-12	118,75A	108,16B	108,27B
	TEST	87,32B	98,80B	120,94B
ITD-19	IAC-AT-8	90,51A	135,38AB	97,18B
	IAC-HT-11	91,92A	135,93AB	143,16A
	IAC-HT-12	98,45A	120,79B	147,92A
	TEST	83,45A	151,73A	157,99A

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical, dentro de cada genótipo

Tabela 6 - Quantidade acumulada e índice de eficiência de utilização do N na parte aérea, no estágio de perfilhamento, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas

Tratamentos	Doses de N, kg ha ⁻¹					
	0	60	120	0	60	120
	N acumulado, g m linear ⁻¹			IEU do N, g ² m linear ⁻¹		
IAC-AT-8	1,06A	3,39A	2,81C	7856A	7046A	5532A
IAC-HT-11	1,16A	2,86AB	3,96A	8139A	5525AB	5402A
IAC-HT-12	1,47A	2,64B	2,96BC	8286A	5196B	5640A
TEST	1,30A	2,58B	3,52AB	6104A	6620AB	5586A

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical

Tabela 7 - Produtividade de grãos de trigo, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas

Tratamentos	Doses de N, kg ha ⁻¹		
	0	60	120
	Produtividade, Kg ha ⁻¹		
IAC-AT-8	1494A	2838A	3069B
IAC-HT-11	1478A	2961A	3391A
IAC-HT-12	1312A	2708A	3067B
TEST	1438A	2862A	2810B

^{1/}Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras são para comparação dos valores na vertical

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)