

OCORRÊNCIA E EFEITO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM GENÓTIPOS DE TRIGO⁽¹⁾

Valéria Marino Rodrigues Sala⁽²⁾, Sueli dos Santos Freitas⁽³⁾, Vanessa Polon Donzeli⁽⁴⁾, José Guilherme Freitas⁽⁵⁾, Paulo Boller Gallo⁽⁶⁾
& Adriana Parada Dias da Silveira⁽³⁾

RESUMO

A pesquisa sobre bactérias diazotróficas na cultura do trigo tem demonstrado a necessidade de associar bactérias eficientes a genótipos promissores, os quais se beneficiariam dessa associação. Em um experimento com parcelas subdivididas, instalado em condições de campo, em Mococa (SP), empregando os tratamentos: três doses de N (0, 60 e 120 kg ha⁻¹) e três genótipos de trigo (IAC-24, ITD-19 e IAC-355), foi avaliada a ocorrência de microrganismos diazotróficos endofíticos em raízes desinfestadas superficialmente, utilizando-se três meios de cultivo distintos, NFb, JNFb e LGI-P. Somente para o genótipo IAC-355, houve um ajuste linear ascendente da quantidade de bactérias diazotróficas com o aumento na quantidade de N adicionada, apesar de o mesmo genótipo apresentar o menor número de bactérias diazotróficas endofíticas nos três meios de cultivo utilizados para quantificação. Foram obtidos oito isolados bacterianos do meio NFb com as características de *Azospirillum* e doze do meio JNFb com as características de *Herbaspirillum*. Esses isolados foram testados "in vitro", nos genótipos dos quais foram originalmente isolados, ou seja, ITD-19 e IAC-24. Todos os isolados testados no genótipo ITD-19 causaram maior crescimento radicular que a testemunha e apenas um isolado do meio JNFb propiciou aumento significativo do N acumulado na parte aérea. A interação planta-bactéria diazotrófica associativa indicou que é possível obter benefícios desta associação.

Termos de indexação: diazotróficos endofíticos, promoção de crescimento, *Triticum*, isolados homólogos, adubação nitrogenada, colonização radicular.

-
- ⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado da primeira autora. Recebido para publicação em fevereiro de 2002 e aprovado em março de 2005.
⁽²⁾ Doutoranda em Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP. Av. Pádua Dias 11, CEP 13418-900 Piracicaba (SP). E-mail: vmrsala@esalq.usp.br
⁽³⁾ Pesquisadora Científica do Instituto Agrônomo – IAC. Centro de Solos e Recursos Ambientais. Caixa Postal 28, CEP 13010-970 Campinas (SP). E-mail: sfreitas@iac.sp.gov.br; apdsil@iac.sp.gov.br
⁽⁴⁾ Professora da Universidade do Vale do São Francisco. Rodovia Juazeiro/Sobradinho s/n, CEP 48900-000 Juazeiro (BA). E-mail: vanessadonzeli@hotmail.com
⁽⁵⁾ Pesquisador Científico do Instituto Agrônomo – IAC. Centro de Grãos e Fibras. E-mail: jfreitas@iac.sp.gov.br
⁽⁶⁾ Pesquisador Científico, Pólo Regional do Nordeste Paulista – APTA. Caixa Postal 58, CEP 13730-970 Mococa (SP). E-mail: polonordestepaulista@aptaregional.sp.gov.br

SUMMARY: *OCCURRENCE AND EFFECT OF DIAZOTROPHIC BACTERIA IN WHEAT GENOTYPES.*

Research on wheat root diazotrophic bacteria has demonstrated the need to associate effective bacteria to promising genotypes, which would benefit from this association. A field experiment was carried out in Mococa County, State of São Paulo, Brazil, using a split-plot design. Treatments consisted of 3 wheat genotypes (IAC-24, ITD-19 and IAC-355) under 3 nitrogen doses (0, 60 and 120 kg ha⁻¹). The occurrence of diazotrophic bacteria was evaluated in three growth media: NFb, JNFb and LGI-P, using surface-sterilized roots. Only in genotype IAC-355 there was a positive linear relationship between the quantity of diazotrophic bacteria with the increasing N doses, though the quantity of endophytic diazotrophic bacteria for this genotype in all three culture media was the lowest one. Eight isolates were obtained from NFb medium, and they presented characteristics of Azospirillum. Twelve isolates were obtained from the JNFb medium and they had characteristics of Herbaspirillum. These strains were tested in vitro using the genotypes from which they had originally been isolated: ITD-19 and IAC-24. All isolates caused an increase in the ITD-19 root length compared to the control, but only one isolate from JNFb medium led to a significant increase in shoot N accumulation. The plant-bacteria interaction demonstrated that it is possible to obtain benefits from this association.

Index terms: diazotrophic endophytic, plant growth promotion, Triticum, homologue isolates, nitrogen fertilization, root colonization.

INTRODUÇÃO

A aplicação de técnicas adequadas desenvolvidas e recomendadas pela pesquisa, como o emprego de cultivares adequados para cada região, adubações equilibradas, práticas de conservação do solo e controle fitossanitário, permitiu o aumento da produtividade na cultura do trigo no estado de São Paulo. No entanto, a demanda crescente pelas culturas alimentícias torna necessária a continuidade da pesquisa em diversos aspectos.

O N constitui o macroelemento mais limitante na produtividade do trigo, visto que determina o número de filhos ou perfilhos, sendo essencial na fase de formação dos nós, no início do alongamento.

O programa atual de melhoramento genético do IAC tem, dentre alguns de seus objetivos principais, o desenvolvimento de variedades eficientes quanto à utilização do adubo nitrogenado, aspecto este intimamente relacionado com a pesquisa microbiológica.

Fertilizantes nitrogenados utilizados em plantas não-leguminosas, como o trigo, constituem um dos mais altos custos da agricultura. Um dos objetivos para agricultura sustentável é o aproveitamento eficiente do N atmosférico (Graham & Vance, 2000). Dentre os sistemas biológicos capazes de aproveitar o N diretamente da atmosfera, a simbiose rizóbio - leguminosas tornou-se o sistema mais especializado, sendo responsável por 22 % de todo o N incorporado ao ecossistema terrestre (Peoples et al., 1995). No Brasil, salienta-se a importância econômica e ecológica da fixação biológica do N₂ com o exemplo da soja, que dispensa totalmente a adubação nitrogenada sem causar perda de produtividade.

Um dos grandes interesses dos pesquisadores é a extensão desses processos biológicos para outras culturas, como gramíneas forrageiras e graníferas, especialmente as de grande importância sócio-econômica. Os cereais constituem a base alimentar mais importante para a população humana e ocupam em torno de 50 % das terras cultivadas. Considerando a extensa área ocupada pelos cereais, aproximadamente cinco vezes a das leguminosas, a fixação biológica associada a essas culturas torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte de suas necessidades de N possa ser suprida.

A partir das observações pioneiras de Döbereiner & Day (1976) de que a utilização de meio de cultivo semi-sólido é a condição ideal para o crescimento de diazotróficos dependentes da fixação biológica do N₂ da atmosfera, 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 O₂ é limitada. Essa descoberta revolucionou e ampliou as pesquisas sobre todos os aspectos da fixação biológica do N₂ nas associações entre diazotróficos e não-leguminosas, chamadas comumente de simbiose associativa ou fixação de N₂ associativa (Baldani et al., 1997).

Durante os últimos anos, bactérias fixadoras de N₂ vêm sendo isoladas e identificadas, incluindo espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, graças à elucidação dos mecanismos de funcionamento da nitrogenase. Essas bactérias não dispõem de mecanismos de proteção ao O₂, demonstrando maior eficiência na utilização de fontes de C para fixação

de N_2 , pelo fato de serem endofíticas (Döbereiner et al., 1995).

Gluconacetobacter diazotrophicus é a única espécie do gênero capaz de fixar N_2 . Sua ocorrência é bastante restrita, estando principalmente associada a plantas ricas em açúcar, como a cana-de-açúcar, batata-doce e capim-camerom, as quais se propagam vegetativamente (Döbereiner et al., 1995). Recentemente, foi constatada por Jimenez-Salgado et al. (1997) a presença de *G. diazotrophicus* em plantas de café, ressaltando a necessidade de que outras culturas sejam pesquisadas quanto à presença do endófito.

Os objetivos deste trabalho foram: avaliar o efeito da adubação nitrogenada e do genótipo da planta na ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas associadas à cultura do trigo e a obtenção de estirpes eficientes, considerando a especificidade genótipo da planta hospedeira-bactéria, que propiciem melhor desenvolvimento da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio de campo

O ensaio de campo foi instalado no Pólo Regional do Nordeste Paulista-APTA, em Mococa, SP, após a cultura do milho, com irrigação por aspersão.

O delineamento experimental utilizado foi em faixas com blocos ao acaso e parcelas subdivididas, com três repetições. As parcelas (1,2 x 24,0 m = 28,8 m²) foram constituídas de três doses de N: sem adubação nitrogenada; com 60 e 120 kg ha⁻¹ de N, na forma de uréia aplicada na linha de plantio. As subparcelas foram constituídas por três genótipos de trigo: IAC-24, *Triticum aestivum hard* L., eficiente quanto à capacidade de utilização do N e não-responsivo à adubação nitrogenada; ITD-19, *Triticum durum* L., ineficiente e não-responsivo, e IAC-355, *Triticum aestivum hard* L., eficiente e responsivo.

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 a análise de solo do experimento (profundidade 0–20 cm): NH_4^+ = 2,2 e NO_3^- = 6,8 mg kg⁻¹, MO = 21 g dm³, pH em $CaCl_2$ = 5,7, P = 44 mg dm³, Ca^{2+} = 37, Mg^{2+} = 11, H + Al = 20, SB = 51,3, CTC = 71 mmol_c dm³, V(%) = 72, B = 0,13, Cu = 1, Fe = 19, Mn = 8,4 e Zn = 2,2 mg dm³.

A adubação com P, K, Zn e B foi feita na forma de superfosfato simples, cloreto de potássio, sulfato de zinco e bórax, respectivamente.

As plantas foram amostradas 40 dias após a semeadura, na fase de perfilhamento. Em cada parcela experimental, colheram-se plantas em 60 cm lineares de uma das linhas centrais.

Bactérias diazotróficas endofíticas

Quantificação de bactérias endofíticas diazotróficas

Para quantificar as bactérias endofíticas diazotróficas, foram tomados 10 g de raízes de cada parcela, as quais foram submetidas à desinfecção superficial com solução de cloramina-T a 1 % por 15 min. Seguiu-se a lavagem com água destilada por 5 min e a transferência para uma solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0), lavando-se posteriormente, com água esterilizada.

As raízes desinfestadas foram trituradas, com solução de sacarose a 4 %, por dois minutos. A seguir, foram feitas diluições seriadas das amostras em solução de sacarose, de 10⁻² a 10⁻⁷.

A contagem foi feita pela adição de 0,1 mL de cada diluição em meio semi-sólido para o diazotrófico desejado, ou seja, NFB, JNFB e LGI-P, para *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus*, respectivamente (Döbereiner et al., 1995). Foram utilizados cinco frascos por diluição, avaliando-se por meio do método do número mais provável, baseado na presença ou ausência de película formada no meio semi-sólido após sete dias de incubação a 28 °C.

Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas endofíticas

O isolamento e a caracterização basearam-se nas técnicas descritas em Döbereiner et al. (1995). Para proceder ao isolamento, as películas foram retiradas dos tubos de maior diluição, com uma alça de platina, e transferidas para um novo meio semi-sólido até que uma nova película fosse formada. Após 10 dias, as películas foram transferidas para placas de Petri com meio sólido específico para cada diazotrófico, acrescido de 20 mg de extrato de levedura por litro. Para purificação final, as películas foram transferidas para placa de Petri que continha meio BDA. Todo esse processo foi repetido várias vezes para obtenção de culturas puras, com as características dos gêneros pesquisados. Foi realizado teste de redução de acetileno (ARA), para verificar a capacidade de fixação de N_2 "in vitro". A morfologia das culturas foi observada microscopicamente, inclusive em contraste de fase com objetivo de distinguir os gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, considerando que os últimos apresentavam grânulos de poli-hidróxi-butirato que brilham quando observados.

Interação entre genótipos de trigo e diazotróficos endofíticos

O ensaio utilizou tubos de 200 mL que continham solução de Hoagland & Arnon (1950) sem N e 0,6 % de ágar. Foram empregados 20 isolados, com três repetições. As bactérias foram inoculadas antes da solidificação do ágar, após atingir a fase log de crescimento em meio JNFB, sendo utilizado

1 mL da suspensão por tubo. As testemunhas não receberam inóculo. As bactérias foram inoculadas no genótipo do qual foram originalmente isoladas. Foram testados sete isolados com o genótipo ITD-19 e 13 isolados com o IAC-24. Como referência, foram usadas duas estirpes bem caracterizadas, Z-67 de *Herbaspirillum seropedicae* e SP-59b de *Azospirillum lipoferum*, cedidas gentilmente pela Embrapa-Agrobiologia, RJ.

As sementes foram desinfestadas e pré-germinadas em placas de Petri que continham meio BDA, para verificar a ausência de contaminantes (Döbereiner et al., 1995). Esse ensaio foi realizado em condições artificiais de luminosidade, em uma sala de crescimento de plantas, por um período de 30 dias. As plantas foram colhidas, secas em estufa a 60 °C e pesadas para determinação da massa da matéria seca da parte aérea. Posteriormente, foram moídas para determinação do teor de N na parte aérea pelo método micro Kjeldahl (Bremner, 1965). O sistema radicular das plantas foi lavado e determinou-se o comprimento da raiz principal.

Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados pelo programa Minitab, fazendo-se análise da variância seguida da comparação das médias pelo teste t-student a 5 % entre genótipos, levando-se em conta o delineamento em faixas, com parcelas subdivididas e blocos ao acaso, como foi instalado o experimento no campo. Com vistas em comparar as diferentes doses de N, foram feitas regressões polinomiais. Para o experimento de seleção de estirpes "in vitro", foi utilizado o teste de Dunnett a 5 % para comparar os isolados e a testemunha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantificação e ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas

No tratamento em que não houve adição de adubo nitrogenado (dose 0), o genótipo IAC-355 diferiu significativamente dos demais genótipos, apresentando a menor quantidade de diazotróficos endofíticos nos três meios de cultivo empregados (Figura 1). Excluindo a influência de doses de N, o mesmo genótipo apresentou significativamente menor colonização radicular por diazotróficos endofíticos que os demais, os quais não diferiram entre si (Figura 2).

Barraquio et al. (1997), utilizando 25 genótipos de arroz, observaram que as populações de bactérias diazotróficas variaram de 10^5 a 10^8 por grama de raiz, conforme o genótipo envolvido na associação. No presente experimento, a faixa de contagem nas raízes do trigo foi mais ampla, de 10^3 a 10^8 por grama de raiz.

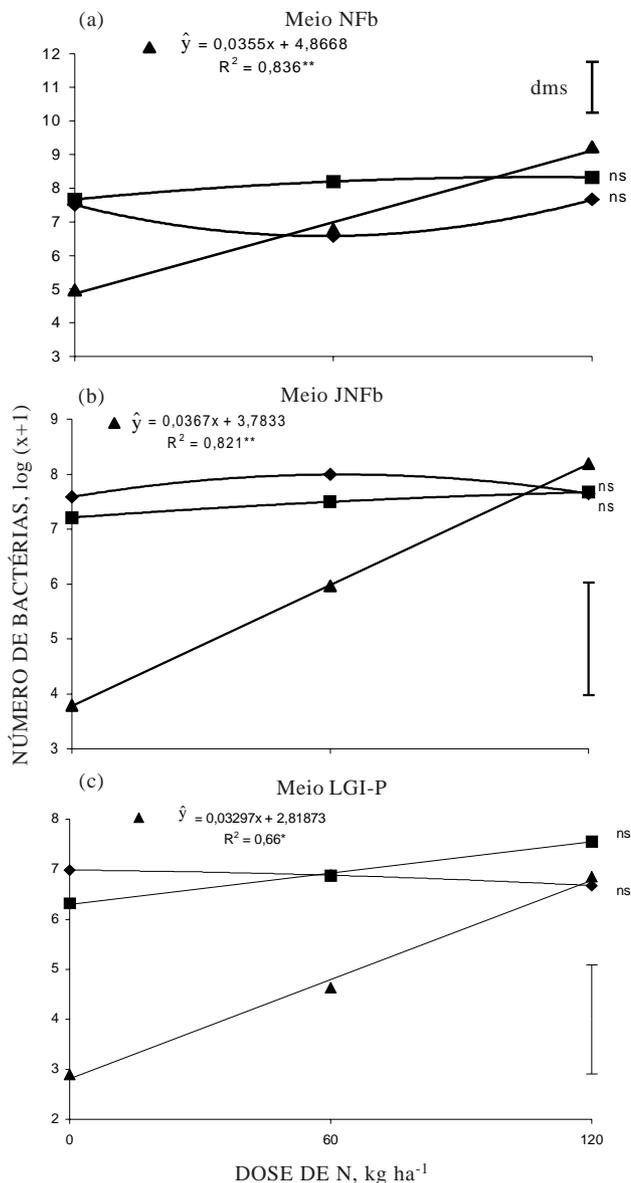


Figura 1. Número de microrganismos diazotróficos endofíticos na raiz de três genótipos de trigo, IAC-24 (◆), ITD-19 (■) e IAC-355 (▲), obtidos em meios NFb (a), JNFb (b) e LGI-P (c) em relação à dose de N adicionada. dms- diferença mínima significativa pelo teste t a 5 % para comparação entre cultivares em uma mesma dose de N (n = 3).

A quantidade de diazotróficos endofíticos no genótipo IAC-355 apresentou regressão linear ascendente, ou seja, houve aumento na quantidade desses microrganismos com o aumento da dose de N, quando utilizados os meios NFb, JNFb ou LGI-P (Figura 1). Para os demais genótipos, o número de diazotróficos endofíticos não se alterou com a adição de N. Esses resultados diferem dos geralmente observados de que o aumento na dose de N diminui a quantidade de diazotróficos na raiz. Kirchoff et

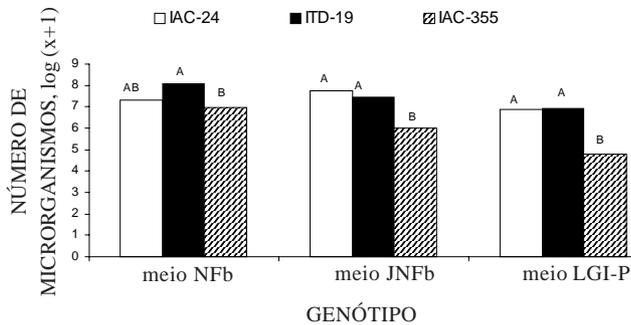


Figura 2. Número de microrganismos diazotróficos endofíticos na raiz de três genótipos de trigo, obtidos nos meios de cultura NFb, JNFb e LGI-P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste t-student dentro de cada meio de cultivo.

al. (1997) observaram que a quantidade de bactérias diazotróficas era menor ou não-detectável em altos níveis de N mineral. Já Muthukumarasamy et al. (1999) observaram que o fertilizante nitrogenado pode alterar o estado fisiológico da planta e, conseqüentemente, afetar as populações destas bactérias. Todavia, em experimentos de campo ou em casa de vegetação, foram obtidas respostas positivas à inoculação, mesmo quando foram utilizados altos níveis de fertilizante nitrogenado (Reynders & Vlassak, 1982; Millet & Feldman, 1984).

Não foi obtido isolado pertencente aos gêneros pesquisados nas raízes desinfestadas superficialmente do genótipo IAC-355. Entretanto, foram obtidos oito isolados com características de *Azospirillum* spp. e 12 de *Herbaspirillum* spp. das raízes dos genótipos IAC-24 e ITD-19, que apresentaram atividade de redução do acetileno *in vitro*. A maioria dos isolados foi obtida nos tratamentos que não receberam fertilizante nitrogenado ou na dose intermediária de N (Quadro 1). O fato de a quantidade de bactérias endofíticas aumentarem nas raízes do genótipo IAC-355 com o aumento na dose de N adicionada, o que não ocorreu nos demais genótipos, não era esperado. Esse genótipo é responsivo à adição de N mineral e, possivelmente, a ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na raiz deveria ser menor, considerando sua menor dependência a elas. Além disso, foram obtidos cinco isolados que demonstraram capacidade de redução de acetileno, porém não mostraram as características descritas em Döbereiner et al. (1995).

Nas condições estudadas, não foi identificado nenhum isolado com as características de *Gluconacetobacter diazotrophicus* nas raízes do trigo desinfestadas superficialmente, apesar de o meio de cultivo LGI-P ter possibilitado alta contagem de microrganismos endofíticos na raiz (Figura 1c). Essa bactéria, embora já isolada da raiz de outras gramíneas, ainda não foi observada colonizando

plantas de trigo. Os meios de cultivo, na verdade, não possibilitaram exclusivamente o isolamento dos gêneros de bactérias diazotróficas para os quais foram recomendados. Muitos microrganismos isolados no meio para *Azospirillum* spp. ou *Herbaspirillum* spp. não apresentavam as características de tais gêneros. Segundo Yanni et al. (1997), a comunidade de diazotróficos cultiváveis é extremamente variada e somente poucas bactérias já foram identificadas e caracterizadas. A identificação precisa do gênero ou espécie de endofítico diazotrófico somente poderá ser realizada pelo emprego de técnicas moleculares.

Stoltzfus et al. (1997) analisaram 133 isolados obtidos de plantas de arroz, pelo uso de meio semi-sólido e constataram que 120 desses isolados não apresentavam atividade de redução do acetileno (ARA) e genes *nifD*. No presente trabalho, verificou-se que nem todos os isolados apresentaram ARA positivo, apesar de mostrarem a película característica.

Interação entre genótipos de trigo e bactérias diazotróficas endofíticas

Uma das variáveis que contribui para a complexidade das respostas à inoculação é a interação do genótipo da planta e a estirpe inoculada, como constatado pelos resultados.

Com relação ao crescimento da raiz principal, observou-se que as plantas do genótipo ITD-19, colonizadas por qualquer dos isolados testados, apresentaram comprimento de raízes significativamente maior em relação à testemunha (Figura 3a). O mesmo efeito não foi obtido no genótipo IAC-24, no qual apenas o isolado IAC-AT4 causou maior comprimento radicular, enquanto os isolados IAC-HT8 e IAC-AT3 causaram diminuição no comprimento da raiz principal (Figura 3a).

Quadro 1. Isolados obtidos em meio JNFb e NFb do experimento de campo

Dose de N	Genótipo	
	IAC-24	ITD-19
Isolados em meio JNFb		
kg ha ⁻¹		
0	IAC-HT-1	
0	IAC-HT-2	
0	IAC-HT-3	
0	IAC-HT-4	
0	IAC-HT-5	
0	IAC-HT-6	
60	IAC-HT-7	IAC-HT-10
60	IAC-HT-8	IAC-HT-11
120	IAC-HT-9	IAC-HT-12
Isolados em meio NFb		
0	IAC-AT-1	
60	IAC-AT-2	IAC-AT-5
60	IAC-AT-3	IAC-AT-6
60		IAC-AT-7
60		IAC-AT-8
120	IAC-AT-4	

Os benefícios causados por essas bactérias podem ser devidos à produção de fitormônios e não somente à fixação biológica do N_2 (FBN). Já foram observados vários efeitos na morfologia das raízes, como aumento no comprimento, no número e na superfície, aumento na absorção de nutrientes, que podem estar relacionados com substâncias promotoras de crescimento secretadas pela bactéria (Martin et al., 1989). Dobbelaere et al. (1999) verificaram aumento nos pêlos radiculares de plantas de trigo decorrente de auxinas secretadas por *Azospirillum* sp. Além disso, Bhattarai & 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.

Quando se avaliou a massa da matéria seca da parte aérea, não foram obtidas diferenças significativas entre os isolados utilizados e a testemunha, em ambos os genótipos (Figura 3).

Na análise do teor e da quantidade acumulada de N na parte aérea da planta, somente o isolado IAC-HT12, testado no genótipo ITD-19, diferiu significativamente da testemunha, apresentando maior quantidade acumulada de N (Figura 4a). Baldani et al. (2000), utilizando as mesmas condições gnotóbicas, obtiveram aumentos de até 54 % no acúmulo de N em plantas de arroz associado a *Herbaspirillum* spp.

Os resultados obtidos mostram que dos isolados testados poucos foram os que propiciaram algum benefício ao trigo, como também demonstrado por Baldani et al. (2000) em estudo de seleção de *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de arroz. Realmente, um dos pontos cruciais para seleção e manejo desses diazotróficos é a especificidade planta-bactéria, como também constataram Salomone & Döbereiner (1996) e Scholoter & Hartmann (1998).

Reis et al. (2000) indicaram, como estratégia para intensificação da seleção de bactérias diazotróficas associativas, o uso de experimentos em condições gnotóbicas com várias bactérias e um genótipo. Aumentos moderados, em torno de 20 %, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, seriam considerados comercialmente significativos na agricultura moderna (Bashan & Levanony, 1990). A inoculação de bactérias diazotróficas associativas tem-se mostrado eficiente em aumentar a atividade da nitrogenase e propiciar ganhos, principalmente no acúmulo de matéria seca, produção de grãos, concentração de N e outras características agrônomicas na maioria dos estudos, mas também sem efeitos ou com efeitos prejudiciais em outros. Em geral, o efeito da inoculação sobre a produção situa-se em torno de 10 a 30 % e, em alguns casos, valores mais elevados de 50 a 250 % têm sido mencionados (Boddey & Döbereiner, 1988).

Já foi demonstrado que estirpes e genótipos obtidos da mesma localidade são mais eficientes em

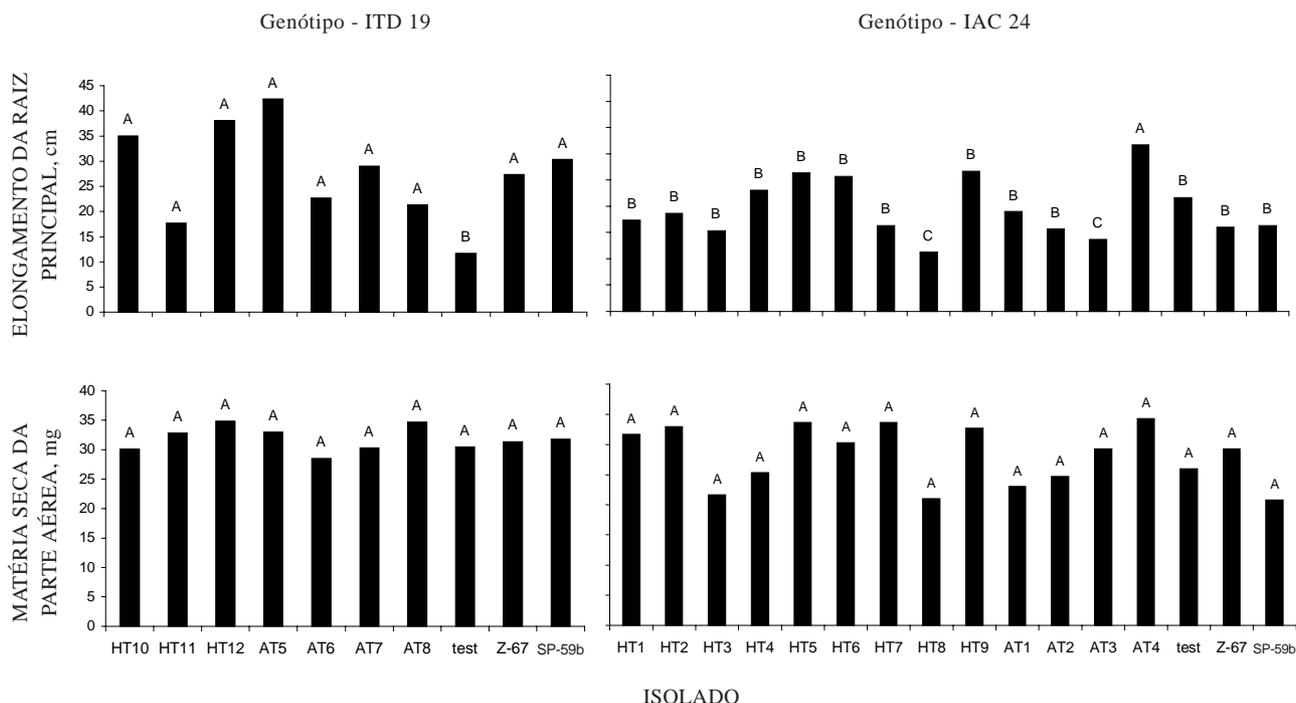


Figura 3. Comprimento da raiz principal, massa da matéria seca da parte aérea dos genótipos de trigo ITD-19 e IAC-24 submetidos a diferentes isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em relação à testemunha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Dunnnett a 5 %. Z-67: estirpe tipo de *Herbaspirillum seropedicae* e SP-59b: estirpe tipo de *Azospirillum lipoferum*.

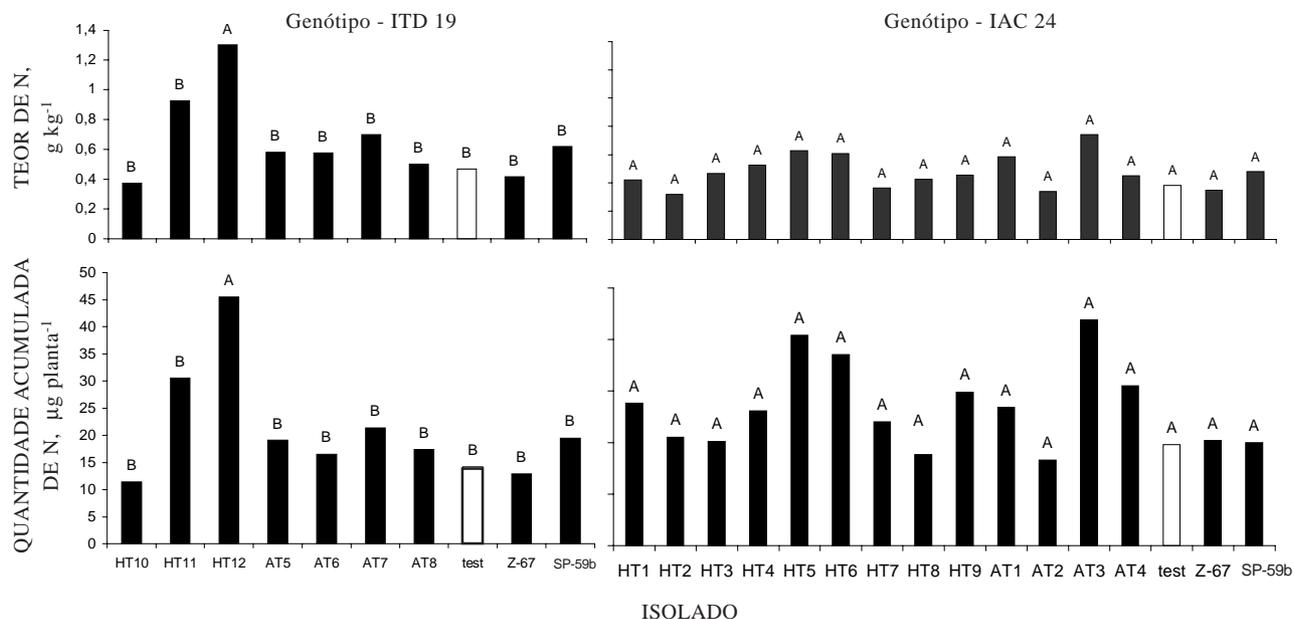


Figura 4. Teor de N na parte aérea, quantidade acumulada de N dos genótipos de trigo ITD-19 e IAC-24 submetidos a diferentes isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em relação à testemunha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Dunnett a 5 %. Z-67: estirpe tipo de *Herbaspirillum seropedicae* e SP-59b: estirpe tipo de *Azospirillum lipoferum*.

proporcionar benefícios (Batharai & Hess, 1993). Em trigo, Baldani & Döbereiner (1980) e Baldani et al. (1986) testaram diferentes estirpes de origens diversas e concluíram que estirpes isoladas da própria espécie vegetal (homólogas) foram mais eficientes do que as isoladas de plantas de outras espécies.

Muitas vezes, as respostas positivas à inoculação são atribuídas à localização das bactérias diazotróficas associativas, pois, ao contrário dos microrganismos diazotróficos rizosféricos que competem com os microrganismos do solo por fontes de C e liberam o N₂ fixado apenas após sua morte, os diazotróficos endofíticos podem colonizar o interior da planta, em um habitat mais uniforme e protegido, explicando os benefícios propiciados por estas bactérias às gramíneas. Isso se aplica ao presente trabalho, visto que as bactérias foram isoladas do interior da raiz.

Resta ainda conhecer os efeitos propiciados pelos isolados eficientes obtidos neste trabalho em condições não-axênicas, verificando sua competitividade em campo, uma vez que a colonização e o estabelecimento das bactérias diazotróficas associativas são influenciadas de maneiras diferentes, dependendo das populações naturais do solo (Baldani et al., 1986). Em solos com pequena ou ausente comunidade nativa de diazotróficos, as respostas à inoculação são mais consistentes e a recomendação de inoculação pode fazer parte do manejo da cultura (Okon, 1985).

CONCLUSÕES

1. A interação do genótipo da planta e a adubação nitrogenada influenciou a quantidade de microrganismos diazotróficos endofíticos nas raízes da cultura do trigo.
2. Nenhum isolado com características de *Glucanoacetobacter diazotrophicus* foi obtido das raízes de trigo desinfestadas superficialmente em meio LGI-P.
3. Bactérias diazotróficas endofíticas promoveram o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo.

LITERATURA CITADA

- BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in infection of cereal with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem., 12:433-440, 1980.
- 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 Soil, 90:35-46, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. Soil Biol. Biochem., 29:922-928, 1997.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Bulkholderia* spp. Biol. Fertil. Soils, 30:485-491, 2000.

- BARRAQUIO, W.L.; LADHA, J.K. & REVILLA, L. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil*, 194:15-24, 1997.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*, 36:591-605, 1990.
- BHATTARAI, T. & HESS, D. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. *Plant Soil*, 151:67-76, 1993.
- 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. *Biol. Fertil. Soils*, 26:72-77, 1998.
- BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. *Plant Soil*, 108:53-65, 1988.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A., ed. *Methods of soil analysis*. Madison, American Society of Agronomy, 1965. p.1149-1178.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen-fixing sites. Washington, 1976, *Proceedings. First international symposium on nitrogen fixation*, (ed.) Newton, W.E. & NYMAN, C.J.N., 1976. p.518-538.
- 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.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A.V. & VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*, 212:155-164, 1999.
- GRAHAM, P.H. & VANCE C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.*, 65:93-106, 2000.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkley, Universidade da California, 1950. 347p. (California Agricultural Experimental Station Circular)
- JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; MARTINEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica*, a new host plant for *A. diazotrophicus* and isolation of others nitrogen fixing acetobacteria. *Applied Environ. Microbiol.*, 63:3676-3683, 1997.
- KIRCHHOF, G.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J. & HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant Soil*, 194:45-55, 1997.
- MARTIN, P.; GLATZLE, A.; KOLB, W.; OMAI, H. & SCHMIDT, W. N₂ fixing bacteria in the rizosphere: quantification and hormonal effects on root development. *Z. Pflanzenern Bodenkd*, 152:237-245, 1989.
- MILLET, E. & FELDMAN, M. Yield response of common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant Soil*, 80:255-259, 1984.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G. & LAKSHMINARASIMAHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugar cane varieties. *Biol. Fertil. Soil*, 29:157-164, 1999.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potencial inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.*, 3:223-228, 1985.
- PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F. & LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soils*, 174:23-28, 1995.
- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. & FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo. Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 1997. 285p. (Boletim, 100)
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L. & DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 19:227-247, 2000.
- REYNDERS, L. & VLASSAK, K. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant Soil*, 66:217-273, 1982.
- SALOMONE, I.G. & DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils*, 21:193-196, 1996.
- SCHOLOTER, M. & HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*, 25:159-179, 1998.
- STOLTZFUS, J.R.; SO, R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, K.K. & BRUJIN, F.J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil*, 194:25-36, 1997.
- 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 Soil*, 194:99-114, 1997.