

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

NOVAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA CULTURA DO TRIGO EM INTERAÇÃO COM A ADUBAÇÃO NITROGENADA, NO CAMPO⁽¹⁾

Valeria Marino Rodrigues Sala⁽²⁾, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso⁽³⁾, Jose Guilherme de Freitas⁽⁴⁾ & Adriana Parada Dias da Silveira⁽⁵⁾

RESUMO

Bactérias diazotróficas pertencentes a diferentes espécies podem estar associadas a gramíneas, como o trigo, promovendo incrementos no crescimento e na produtividade de grãos. Foi realizado um experimento, em condições de campo, com o objetivo de avaliar os benefícios e a viabilidade econômica da inoculação de novos isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas em genótipos de trigo sob diferentes doses de N. Foram empregados três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8-*Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11-*Achromobacter insolitus* e IAC-HT-12-*Zoogloea ramigera*), dois genótipos de trigo (ITD-19-*Triticum durum* L. e IAC-370-*Triticum aestivum hard* L.) e três doses de N (0, 60 e 120 kg ha⁻¹). Foram avaliados, no estágio de perfilhamento e de maturidade fisiológica, a matéria seca, o N acumulado e o índice de eficiência de utilização do N na parte aérea e na colheita; a produtividade de grãos, os componentes de rendimento e os índices de colheita para biomassa e N. No estágio de perfilhamento, somente houve aumento na produção de biomassa com a inoculação de *Azospirillum brasiliense* e *Achromobacter insolitus* no genótipo IAC-370, com a adição de N. Entretanto, não houve especificidade dos genótipos de trigo empregados e essas novas bactérias diazotróficas endofíticas para as demais características avaliadas. Houve aumento no acumulado de N na espiga com a inoculação de *Azospirillum brasiliense*. A inoculação de *Achromobacter insolitus* propiciou aumento da produtividade de grãos, na maior dose de N utilizada (120 kg ha⁻¹). A inoculação, embora não tenha substituído a adubação nitrogenada, reverteu-se em lucro para o agricultor.

Termos para indexação: genótipos de trigo, produtividade de grãos, viabilidade econômica, bactérias promotoras de crescimento de plantas.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Recebido para publicação em dezembro de 2006 e aprovado em março de 2008.

⁽²⁾ Pós-Doutoranda. Centro de Solos e Recursos Ambientais – IAC. E-mail: valeriamarino@uol.com.br

⁽³⁾ Professora Titular do Departamento de Ciência do Solo, ESALQ. Bolsista do CNPq. E-mail: ejbncard@esalq.usp.br

⁽⁴⁾ Pesquisador Científico do Instituto Agrônomo – IAC. Centro de Grãos e Fibras. Caixa Postal 28, CEP 13020-902 Campinas (SP). E-mail: jfreitas@iac.sp.gov.br

⁽⁵⁾ Pesquisadora Científica, Centro de Solos e Recursos Ambientais, IAC. E-mail: apdsil@iac.sp.gov.br

SUMMARY: INTERACTION OF NEW DIAZOTROPHIC ENDOPHYTIC BACTERIA AND NITROGEN FERTILIZATION ON WHEAT CROP UNDER FIELD CONDITIONS

*Diazotrophic bacteria belonging to different species may be associated with grasses, such as wheat, promoting increases in plant growth and grain yield. A field experiment was carried out to evaluate the benefits and economic viability of inoculation of new homologous isolates of endophytic diazotrophic bacteria on wheat genotypes, under varying nitrogen doses. Three strains of endophytic diazotrophic bacteria (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*) were tested on two wheat genotypes (ITD- 19-*Triticum durum* L. and IAC-370-*Triticum aestivum* hard L.) under three doses of nitrogen fertilizer (0, 60 and 120 kg ha⁻¹). Shoot dry matter, shoot N accumulation and N efficiency index were evaluated at tillering and at physiological maturity. Grain yield, yield components and the harvest index for biomass and N were evaluated at harvest. At the tillering stage, only the biomass production of genotype IAC-370 was increased by *Azospirillum brasiliense* and *Achromobacter insolitus* inoculation and N addition. However, the effect of these new diazotrophic endophytic bacteria strains was not genotype-specific for other parameters. *Azospirillum brasiliense* inoculation increased spike N content. At the highest nitrogen level (120 kg ha⁻¹), *Achromobacter insolitus* increased the grain yield. Although inoculation did not substitute N fertilizers, it had a positive effect on the farmers' profit.*

Index terms: wheat genotypes, grain yield, economic viability, plant growth promoting bacteria.

INTRODUÇÃO

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) podem auxiliar por diversos mecanismos na nutrição nitrogenada das culturas. 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). Dentre esses mecanismos, destacam-se a 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 & Hognin, 1997; Zaied et al., 2003), o aumento do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo (Boddey et al., 1986) e a 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 & 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 %, variação ocorrida 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 teor de matéria orgânica (Dobbelaere et al., 2002), e à comunidade nativa de microrganismos (Baldani et al., 1986).

Tem sido demonstrado que estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecer nas raízes, quando inoculadas na mesma espécie vegetal, sendo denominadas estirpes homólogas (Baldani & Baldani, 2005). Além disso, admite-se ser o genótipo da planta fator-chave para obtenção dos benefícios causados por bactérias diazotróficas endofíticas (Reis et al., 2000).

Um fator importante para o sucesso da inoculação em experimentos de campo é o estabelecimento e a multiplicação do microrganismo, que terá de competir com isolados nativos do solo e 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 certos países, como a Itália e a França, o inoculante com *Azospirillum* 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).

Os isolados IAC-AT-8, *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*, e IAC-HT-12, *Zoogloea ramigera*, foram obtidos de raízes de trigo desinfetadas superficialmente. Foram selecionados devido ao seu desempenho positivo em experimento realizado em condições gnotobióticas (Sala et al., 2005) e em casa de vegetação com substrato esterilizado (Sala et al., 2007b). Entretanto, muitas vezes, os resultados obtidos nessas condições não são repetidos no campo, pois há uma complexa interação planta-bactéria-ambiente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições de campo, o efeito e a viabilidade econômica da inoculação de novos isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas, sob diferentes doses de N, em dois genótipos de trigo.

MATERIAL E MÉTODOS

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

O delineamento experimental utilizado foi de parcelas subdivididas ($1,2 \times 24,0 \text{ m} = 28,8 \text{ m}^2$), com quatro repetições: na parcela, três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12); na subparcela, dois genótipos de trigo (ITD-19, *Triticum durum* L. e IAC-370, *Triticum aestivum hard* L.), e, na subsubparcela, três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha^{-1}). A aplicação do fertilizante nitrogenado foi parcelada, adicionando-se 70 % no plantio e 30 % após 30 dias da semeadura. O espaçamento utilizado entrelinhas foi de 0,15 m e as dimensões da parcela experimental de 4,0 m de comprimento e 1,2 m de largura.

Para o preparo dos inoculantes, os isolados foram repicados em meio de cultura líquido acrescido de N, 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 h. Foi utilizada turfa em pó como carreador, com 10^9 células g^{-1} de turfa, o que representou aproximadamente 30 mL de meio de cultura para 100 g de turfa. Na contagem do número de bactérias, foram utilizados os mesmos meios semi-sólidos e sem adição de N. O inóculo foi misturado na semente no momento do plantio; foram utilizados 450 g ha^{-1} de inóculo, aproximadamente 30 % a mais que a quantidade recomendada para a cultura da soja. O plantio foi realizado mecanicamente.

Os isolados utilizados: IAC-AT-8 - *Azospirillum brasiliense* (acesso no Genbank nº 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 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 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, 50 cm de planta, de uma das linhas centrais, coletando-se a parte aérea. A produção de

matéria seca foi obtida após secagem das plantas em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ com circulação de ar. Posteriormente, procedeu-se à moagem e homogeneização para determinação do teor de N pelo método micro-Kjeldahl (Bremner, 1965) e foram calculados a quantidade acumulada (g m^{-1} de N) e o índice de eficiência de utilização (matéria seca da parte aérea² por quantidade acumulada do nutriente), segundo Siddiqi & Glass (1981). Por ocasião da colheita, foram avaliados a produtividade de grãos, em uma área de $2,0 \text{ m}^2$ por canteiro, os principais componentes de rendimento e as análises econômicas (Nogueira, 1997).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa Sanest, fazendo-se análise da variância, regressão polinomial para doses de N e teste de Duncan a 5 % para comparação do efeito da inoculação das bactérias diazotróficas.

RESULTADOS

No estágio de perfilhamento, com a adição de N, houve aumento da matéria seca das plantas do genótipo IAC370 com o emprego de *A. brasiliense*, nas doses de 60 e 120 kg ha^{-1} de N, e com *A. insolitus*, na dose de 120 kg ha^{-1} de N, em relação ao tratamento-testemunha (Figura 1). Houve ajuste quadrático em relação às doses de N com *A. brasiliense*, com ponto de máximo na dose de 77 kg ha^{-1} de N. Entretanto, para a testemunha e com *A. insolitus*, o ajuste foi linear (Figura 1). As plantas do genótipo IAC370, na presença de *Z. ramigera*, no tratamento sem a adição de N, apresentaram produção de matéria seca superior à das plantas da testemunha e similar à das plantas cultivadas nas doses 60 e 120 kg ha^{-1} de N (Figura 1). Para o genótipo ITD19, no estágio de perfilhamento, não houve influência da inoculação sobre a biomassa das plantas (dados não apresentados).

Nesse estágio, não houve diferenças entre os genótipos das plantas quando foram avaliados a quantidade acumulada e o índice de eficiência de utilização (IEU) do N. Com a inoculação de *A. brasiliense*, as plantas apresentaram maior quantidade acumulada de N com a adição de 60 kg ha^{-1} de N, em relação ao tratamento-testemunha, e houve a mesma tendência quando avaliado o IEU de N (Figura 2a,b). Houve um ajuste quadrático em relação às doses de N adicionadas, com ponto de máximo na dose de 78 kg ha^{-1} de N, quando avaliado o N acumulado na parte aérea (Figura 2a). Porém, houve ajuste linear decrescente entre o índice de eficiência de utilização do N sob influência do mesmo isolado e a dose de N adicionada (Figura 2b), indicando que o aumento obtido na produção de matéria seca da parte aérea foi proporcionalmente menor ao aumento da dose de N, quando passou de 60 para 120 kg ha^{-1} de N.

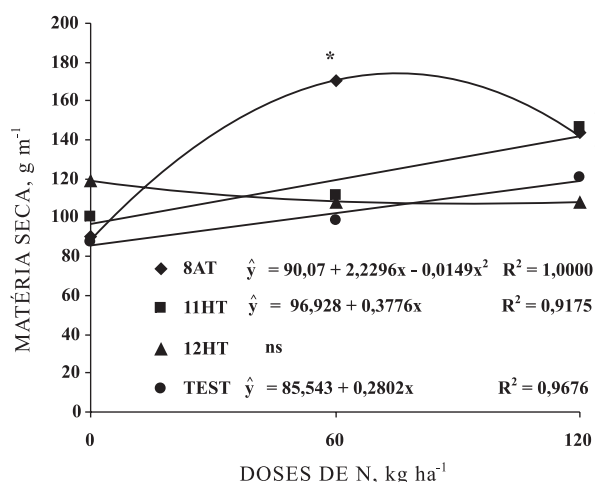


Figura 1. Matéria seca da parte aérea do genótipo IAC-370, no estágio de perfilhamento, em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (■), IAC-HT-11 (◆), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, para isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.

No estágio de maturidade fisiológica, não houve influência do genótipo e das doses de N empregadas nas variáveis analisadas. Independentemente do genótipo ou da dose de N, houve, com o emprego de *A. brasiliense*, tendência de aumento da matéria seca da folha e do colmo (Quadro 1). Além disso, houve aumento significativo no N acumulado na espiga com a inoculação desse isolado, em relação ao tratamento-testemunha. Entretanto, somente *A. insolitus* promoveu o aumento da massa das espigas (Quadro 1). Observou-se tendência de aumento no índice de eficiência de utilização do N promovida pela inoculação (Quadro 1).

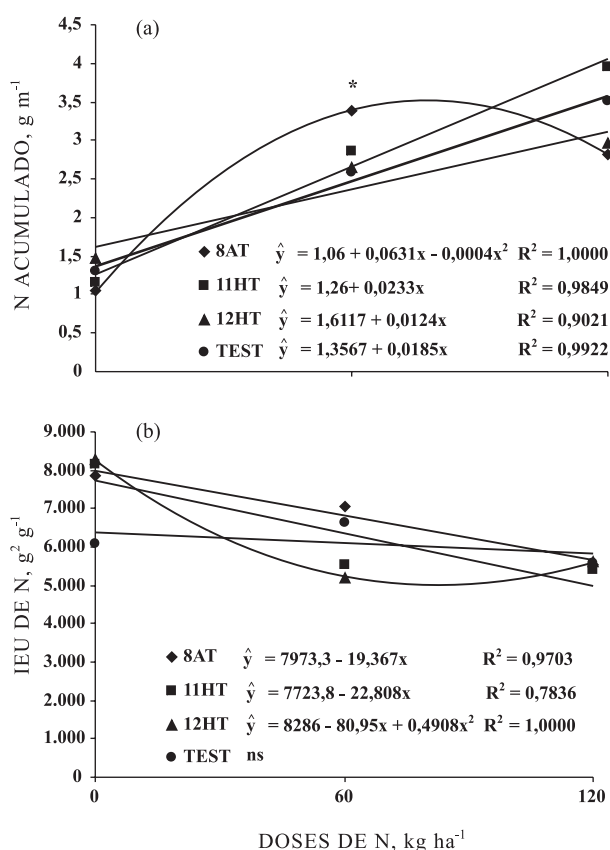


Figura 2. Acúmulo (A) e índice de eficiência de utilização (B) do nitrogênio na parte aérea da planta, média de dois genótipos (ITD-19 e IAC-370), no estágio de perfilhamento, em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (■), IAC-HT-11 (◆), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, para isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.

Quadro 1. Matéria seca, nitrogênio acumulado e índice de eficiência de utilização do nitrogênio, no estágio de maturidade fisiológica, sem ou com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de dois genótipos (ITD19 e IAC370) e três doses de nitrogênio

Isolados	Matéria seca		N acumulado		IEU do N	
	Folha + colmo	Espiga	Folha + colmo	Espiga	Folha + colmo	Espiga
	g m^{-1}				$\text{g}^2 \text{g}^{-1}$	
IAC-AT-8	87,49A ⁽¹⁾	139,52A	0,547A	2,05A	15,282A	10,266A
IAC-HT-11	79,93A	134,71A	0,403B	1,79B	16,775A	10,592A
IAC-HT-12	83,39A	128,91A	0,460AB	1,57B	16,800A	10,881A
TEST	80,61A	129,22A	0,494AB	1,76B	14,147A	9,795A

⁽¹⁾ Letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Independentemente do genótipo utilizado, a inoculação de *A. insolitus* promoveu aumento na produtividade de grãos na maior dose de N utilizada (120 kg ha⁻¹), propiciando aumento de 17 % (580 kg ha⁻¹ de grãos) em relação ao tratamento-testemunha (Figura 3). Verificou-se ajuste quadrático em relação às doses de N adicionadas para todos os tratamentos empregados. A produtividade máxima com a inoculação foi obtida com a adição de aproximadamente 110 kg ha⁻¹ de N, enquanto, no tratamento-testemunha, o ponto de máximo foi obtido

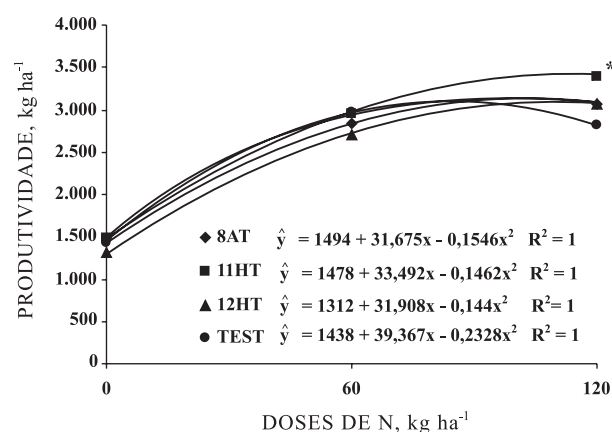


Figura 3. Produtividade de grãos de trigo, média de dois genótipos (ITD-19 e IAC-370), em relação às doses de nitrogênio adicionadas sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8 (■), IAC-HT-11 (◆), IAC-HT-12(▲) e testemunha sem inoculação (●). Asterisco – difere significativamente pelo teste de Duncan 5%, para isolados bacterianos em relação à testemunha, na mesma dose de N.

com uma dose inferior de N (85 kg ha⁻¹ de N). Não houve influência significativa da inoculação em relação ao tratamento-testemunha sobre os componentes de rendimento avaliados (Quadro 2).

DISCUSSÃO

No estágio de perfilhamento com a adição de 120 kg ha⁻¹ de N, a inoculação de *A. insolitus* promoveu aumento da biomassa (Figura 1), observando-se tendência de aumento do N acumulado em relação ao tratamento-testemunha (Figura 2). Entretanto, a inoculação de *A. insolitus* mostrou a menor quantidade de N acumulado no período após o perfilhamento (Quadro 2), evidenciando que, possivelmente, a maior contribuição da inoculação desse isolado tenha sido no período de desenvolvimento vegetativo da cultura, o que possibilitou maior afilamento e, conseqüentemente, maior número de espigas por m² (Figura 4), culminando no aumento da produtividade de grãos.

No estágio de maturidade fisiológica, a inoculação de *A. insolitus* causou aumento da massa de matéria seca das espigas e do IEU do N (Quadro 1). Possivelmente, o aumento do IEU do N, sem que tenha ocorrido um aumento do N acumulado, pode ser um indicativo de maior atividade das enzimas responsáveis pela assimilação do N. Apesar de não existirem trabalhos com as enzimas relacionadas com o metabolismo do N em plantas infectadas por bactérias do gênero *Achromobacter*, há vários relatos utilizando mutantes de *Azospirillum* redutase do nitrato negativos (Boddey et al., 1986), demonstrando que os benefícios em plantas de trigo propiciados pela inoculação são devidos ao aumento na atividade da redutase do nitrato.

Quadro 2. Massa de 100 grãos, nitrogênio acumulado após o perfilhamento, número de grãos por espiga, número de espigas m⁻², número de grãos m⁻², índice de colheita para massa e índice de colheita para nitrogênio, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de dois genótipos (ITD19 e IAC370) e três doses de nitrogênio

Variável	Isolado			
	IAC-AT-8	IAC-HT-11	IAC-HT-12	TEST
Massa 100 grãos, g	5,11A ⁽¹⁾	4,82AB	4,60B	4,73AB
N acumulado após perfilhamento, g m ⁻¹	2,32A	1,28B	1,43B	1,66B
Número grãos/espiga	20,24A	20,93A	21,83A	20,44A
Número de espigas m ⁻²	467A	472A	462A	452A
Número de grãos m ⁻²	9.558A	10.058A	9.889A	9.164A
Índice de colheita (massa), %	60,87A	62,00A	60,17A	60,96A
Índice de colheita (N), %	42,56A	45,05A	42,15A	42,12A

⁽¹⁾ Letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %.

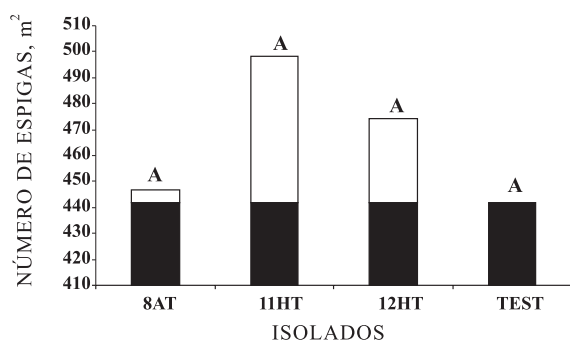


Figura 4. Número de espigas m⁻² na dose de 120 kg ha⁻¹ de N, média de dois genótipos (ITD-19 e IAC-370), sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas IAC-AT-8, IAC-HT-11, IAC-HT-12 e testemunha (TEST) sem inoculação. A parte escura do histograma refere-se à testemunha. Letras iguais não diferem pelo teste de Duncan a 5 %.

O aumento da produtividade do trigo também pode estar relacionado com a maior massa de grãos em relação à fitomassa. Os índices de colheita para massa ou para N, que representam a relação entre a massa de grãos e a massa total da planta ou a quantidade acumulada de N no grão e a quantidade total de N na planta, são indicadores sensíveis da translocação eficiente dos compostos fotossintetizados da parte vegetativa para os grãos (Xu et al., 2005). Didonet et al. (2000) demonstraram aumento do índice de colheita em plantas de trigo na presença de isolados de *Azospirillum* em relação à testemunha. Houve tendência de aumento no índice de colheita com a inoculação de *A. insolitus* (Quadro 2) e houve correlação do índice de colheita para massa ($r = 0,72$ e $p < 0,000001$) e para N acumulado ($r = 0,57$ e $p < 0,0001$) com a produtividade, podendo ser esse efeito responsável pelo aumento da produtividade de grãos propiciada pelo mesmo isolado.

Um dos pontos cruciais para seleção e manejo desses diazotróficos é a especificidade planta-bactéria (Baldani & Baldani, 2005), sendo demonstrado por Antonyuk & Evseeva (2006) que as lectinas produzidas por 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 da interação planta-bactéria. No presente trabalho, observou-se que, apesar de esses isolados terem sido obtidos de raízes desinfestadas superficialmente do genótipo ITD19 (Sala et al., 2005), somente houve diferenças em relação ao genótipo IAC370 no estágio de perfilhamento e, ainda, somente quando avaliada a biomassa. Entretanto, com maior desenvolvimento vegetativo das plantas, no estágio de maturidade fisiológica e na colheita final, quando avaliados a produtividade de grãos e os principais componentes de rendimento, os genótipos comportaram-se igualmente em relação à inoculação.

Alguns autores observaram 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). Observou-se no presente trabalho 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 bacterianos. Provavelmente, a inoculação das bactérias causou alguma modificação fisiológica e, ou, morfológica nas plantas de trigo, de tal modo que a dose mais alta de N não representou consumo de luxo para as plantas. Ainda, esse efeito pode ser devido à melhor interação planta-bactéria diazotrófica nessa condição, uma vez que os isolados utilizados foram obtidos de plantas de trigo na presença de adubação nitrogenada (Sala et al., 2005).

O aumento na produtividade causado pela inoculação de *A. insolitus* e adição de 120 kg ha⁻¹ de N demonstra que outros mecanismos, que não a fixação biológica de N₂, 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 também poderia ser atribuído a uma possível seleção natural e, ou, uma adaptação na associação planta-bactéria diazotrófica, uma vez que o isolado de *A. insolitus* foi obtido de plantas de trigo na presença de adubação nitrogenada (Sala et al., 2005). Esse resultado concorda com o obtido anteriormente em outro experimento realizado em condições de campo, no qual houve aumento na produtividade de trigo propiciada pela inoculação de *A. insolitus* e adição de 120 kg ha⁻¹ de N (Sala et al., 2007a), superando em 26 % o tratamento-testemunha. No presente trabalho, esse acréscimo na produção foi de 17 %.

Existem poucos relatos na literatura dos efeitos causados pela inoculação de bactérias pertencentes ao gênero *Achromobacter* em plantas. Entretanto, foi observado que um isolado da parte aérea de planta de ervilha, identificado por características morfológicas e fisiológicas como pertencente ao gênero *Achromobacter*, produzia indóis em cultura pura de células (Libbert & Risch, 1968). 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. Mais recentemente, foi observado que um isolado de *Achromobacter* proporcionou resistência à salinidade (Mayak et al., 2004a) e ao estresse hídrico (Mayak et al., 2004b) a plantas de tomate.

Embora a inoculação de *A. insolitus* não tenha substituído a adubação nitrogenada, indicando uma redução no N adicionado como fertilizante, a inoculação reverteria em lucro para o agricultor. Admitindo 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, 2007), em outubro de 2007, pode-se estabelecer o limite em que o acréscimo no custo do N aplicado é mais bem compensado pelo acréscimo na produtividade de grãos, ou seja, a produtividade máxima econômica (Nogueira, 1997). Esta corresponde à quantidade aplicada de N que proporciona a máxima distância entre a linha de custo do insumo e a curva de resposta por unidade de área. Assim, a dose de N que proporcionou o maior retorno econômico para o tratamento-testemunha foi de 71,47 kg ha⁻¹ de N e com a inoculação de *A. insolitus* foi de 93,74 kg ha⁻¹ de N, obtendo-se uma produtividade de grãos de 3.062 e de 3.333 kg ha⁻¹, respectivamente. Portanto, baseando-se no preço do inoculante turfoso utilizado para cultura da soja, o gasto com a inoculação seria de R\$ 5,40 ha⁻¹, proporcionando um lucro de R\$ 42,00 ha⁻¹ com o emprego de *A. insolitus* em relação ao tratamento-testemunha, mesmo utilizando maior quantidade de uréia. Também, considerando a quantidade de grãos produzida com a adição de 120 kg ha⁻¹ de N subtraída da produzida sem adição de N (dose 0 de N), verificou-se que para cada quilo de N aplicado a inoculação propiciou aumento na produção de grãos, tendo esses aumentos variado de 1,70 kg, com o emprego de *A. brasiliense*, até 4,50 kg com *A. insolitus*, em relação ao tratamento-testemunha.

Considerando, ainda, o custo do inoculante e o preço do trigo, 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 (Quadro 4). Subtraindo-se o gasto com o adubo (120 kg = R\$ 256,00) e com a inoculação (R\$ 5,40), seriam obtidos lucros de R\$ 85,00 ha⁻¹ com a inoculação *A. brasiliense* e *Z. ramigera* e de R\$ 200,00 ha⁻¹ com *A. insolitus*, justificando a prática da inoculação nessa dose de N.

Provavelmente, a comunidade nativa de microrganismos e, ou, as condições de cultivo influenciaram as respostas à inoculação. Apesar de o isolado IAC-HT-11, *A. insolitus*, ter causado aumento significativo da produtividade de grãos, em experimento prévio realizado em casa de vegetação com substrato esterilizado, a inoculação deste isolado propiciou o dobro de matéria seca, quantidade acumulada e índice de eficiência de utilização do N em plantas de trigo (Sala et al., 2007b), o que não ocorreu no presente trabalho, realizado em condições de campo. Entretanto, os aumentos na produtividade de grãos e na lucratividade com a inoculação *A. insolitus* são, na verdade, os efeitos mais importantes para o agricultor.

CONCLUSÕES

1. Não se observou especificidade dos genótipos de trigo empregados e essas novas bactérias endofíticas.
2. Verificou-se aumento de produção de grãos com a inoculação do isolado IAC-HT-11 - *Achromobacter insolitus* - na cultura do trigo, proporcionando maior rentabilidade.
3. O maior incremento na produtividade de grãos foi obtido com a inoculação de *Achromobacter insolitus* e com a adição de fertilizante nitrogenado na maior dose utilizada (120 kg ha⁻¹ de N).

AGRADECIMENTOS

À técnica Rosana Gierts Gonçalves e ao Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo, pelo auxílio na realização do experimento de campo. À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, e à FAPESP, pelo auxílio ao projeto (Processo nº 04/15053-5).

LITERATURA CITADA

- ANTONYUK, L.P. & EVSEEVA, N.V. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. *Microbiology*, 75:470-475, 2006.
- BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Ci.*, 77:549-579, 2005.
- 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.
- BASHAN, Y. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.*, 3:297-301, 1986.
- BASHAN, Y. & de-BASHAN, L.E. Plant growth-promoting. In: HILLEL, D. *Encyclopedia of soil in the environment*. Oxford, Elsevier, 2005. p.103-115.
- BASHAN, Y. & HOGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationship: Environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*, 43:103-121, 1997.
- 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.). *Can. J. Microbiol.*, 46:229-236, 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 Soil*, 95:109-121, 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/conabweb/download/precos_minimos/emvigor/DECRETO_N_6149_de_10_julho_de_2007.pdf>. Acesso em: 4 de Out. de 2007.
- 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. Brazil. Arch. Biol. Technol., 47:843-850, 2004.
- DIDONET, D.A.; LIMA, O.S.; CANDATEN, M.H. & RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. Pesq. Agropec. Bras., 35:401-411, 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. Biol. Fert. Soils, 36:284-297, 2002.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, Embrapa, SPI; CNPAB, 1995. 60p.
- INIGUEZ, A.L.; DONG, Y. & TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. Molec. Plant Microbiol. Interact., 17:1078-1085, 2004.
- LIBBERT, E. & RISCH, H. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. Physiol. Plant., 22:51-58, 1968.
- MAYAK, S.; TIROSH, T. & GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiol. Biochem., 42:565-572, 2004a.
- MAYAK, S.; TIROSH, T. & GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. Plant Sci., 166:525-530, 2004b.
- 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 Soil, 82:87-99, 1984.
- MILLET, E. & FELDMAN, M. Yield response of common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. Plant Soil, 80:255-259, 1984.
- NOGUEIRA, M.C.S. Estatística experimental aplicada à experimentação agrônoma. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997. 250p.
- OGÜT, M.; AKDAG, C.; DUZDEMIR, O. & SAKIN, A.M. Single and double inoculation with *Azospirillum/Trichoderma*: The effects on dry bean and wheat. Biol. Fert. Soils, 41:262-272, 2005.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends Biotechnol., 3:223-228, 1985.
- OKON, Y. & LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem., 26:1591-1601, 1994.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. Crit. Rev. Plant Sci., 3:227-247, 2000.
- REYNDERS, L. & VLASSAK, K. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. Plant Soil, 66:217-273, 1982.
- ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.O.; SELBACH, P.A. & SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. Ci. Rural, 35:1201-1204, 2005.
- SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G. & SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. Pesq. Agropec. Bras., 42:833-842, 2007a.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S. & SILVEIRA, A.P.D. Interação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. Pesq. Agropec. Bras., 42:1593-1600, 2007b.
- 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. R. Bras. Ci. Solo, 29:345-352, 2005.
- SAUBIDET, M.I.; FATTA, N. & BARNEIX, A.J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. Plant Soil, 245:215-222, 2002.
- SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. J. Plant Nutr., 4:289-312, 1981.
- XU, Z.Z.; YU, Z.W.; WANG, D. & ZHANG, Y.L. Nitrogen accumulation and translocation for winter wheat under different irrigation regimes. J. Agron. Crop Sci., 191:439-444, 2005.
- 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. Pakist. J. Biol. Sci., 4:344-358, 2003.
- ZAMBRE, M.A.; KONDE, B.K. & SONAR, K.R. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. Plant Soil, 79:61-67, 1984.