

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

JULIANE MENDES LEMOS

**RESPOSTA DE CULTIVARES DE TRIGO À INOCULAÇÃO EM SEMENTES
COM *Azospirillum brasilense*, E À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM
COBERTURA**

**Marechal Cândido Rondon
2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

JULIANE MENDES LEMOS

**RESPOSTA DE CULTIVARES DE TRIGO À INOCULAÇÃO EM SEMENTES
COM *Azospirillum brasilense*, E À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM
COBERTURA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Strictu sensu* como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
Co-Orientadores: Profa Dra. Maria do Carmo Lana
Profa. Dra. Marise Fonseca dos Santos

**Marechal Cândido Rondon
2011**

**Folha de Aprovação (CÓPIA DA ATA DE DEFESA NA SECRETARIA DO PROGRAMA)
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

JULIANE MENDES LEMOS

**RESPOSTA DE CULTIVARES DE TRIGO À INOCULAÇÃO EM SEMENTES
COM *Azospirillum brasilense*, E À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM
COBERTURA**

Dissertação apresentada como pré-requisito de conclusão de curso de
Mestrado em Agronomia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Marechal Cândido Rondon, 28/03/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos
(Co-orientadora)

Prof.^a Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa

**À minha amada família,
Dedico!**

Agradecimentos

À Deus, por estar sempre junto de mim mesmo nos momentos em que me distancio Dele.

Aos meus pais, por me apoiarem em mais uma etapa de minha vida.

Ao meu irmão Thiago, por sempre me dar força.

Aos demais familiares, avós, tios e primos que mesmo distantes nunca deixaram de me apoiar.

Ao meu namorado Éverton Blainski, pessoa que dividi grandes momentos e que me fez um bem incalculável.

Ao Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães, pela orientação, compreensão, profissionalismo e pelos ensinamentos.

Aos professores do setor de ciências agrárias e funcionários do campus, em especial, o Prof. Dr. Cláudio Yuji Tsutsumi e os funcionários Alfeo Seibert Filho, Marta Bianchini e Juceney Frandoloso, pelos ensinamentos, pelo convívio e pelo auxílio em muitas atividades.

Às professoras da UFPR – campus Palotina, Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo e Marise Fonseca dos Santos, pelo incentivo, amizade e valiosas correções.

Às famílias Maciel, Meinerz e Formigheri pelo apoio e acolhida principalmente no início do mestrado.

Aos colegas do mestrado, pelo companheirismo e amizade principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos divertidos alunos da graduação em agronomia, em especial, os formandos de 2010 e os formando de 2011, pelos momentos de diversão.

Aos estagiários e professores do LaBioGen – UFPR campus Palotina, pela acolhida e pelos serviços prestados.

Aos meus queridos amigos, Cristiane Meinerz, Tiago Zoz, Luiz Offemann, Adeline Neiverth, Adriano Busnello, Viviane Ruppenthal, Luana Sandmann e João Francisco, Deise Castagnara, não só pelo apoio e ajuda prestada, mas também pelos maravilhosos momentos de descontração que me proporcionaram.

Aos colegas, Mônica Anghinoni, Artur Soares, Patrícia Favoreto, pela ajuda indispensável neste trabalho.

Ao pessoal das caronas, em especial, Rafael Lazaro e Paulo Barbosa, que entre tantas idas e vindas, fizeram minhas viagens além de mais fácies muito mais agradáveis.

Às minhas queridas amigas Cleuza Montanucci, Adeline Neiverth, Luana Sandmann e Tatiane Modolon por terem disponibilizado suas casas sempre que precisei de pouso.

À coordenação do curso de Pós-graduação, pelo incentivo e apoio.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela acolhida.

Ao INCT/CAPES, pela bolsa concedida.

À empresa de pesquisa COODETEC, pelos materiais cedidos.

À Universidade Federal do Paraná e ao INCT – FBN, pela parceria.

Enfim, agradeço a todo sorriso, toda disponibilidade e carinho de todos que me cercam e as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta conquista.

Muito obrigada!

"O homem que deseja ser cientista e à ciência dedicar seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente)."
(Freire-Maia)

Sumário

Lista de tabelas

Resumo

Abstrat

1. Introdução	16
2. Revisão Bibliográfica	
2.1 A Cultura do Trigo.....	18
2.2 Nitrogênio no Solo e na Planta.....	19
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	22
2.4 Nitrogenase.....	23
2.5 Amônio.....	24
2.6.Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas.....	27
2.7 Uso de <i>Azospirillum</i> como Inoculante de Cereais.....	28
2.8 Aspectos Fisiológicos, Morfológicos e Bioquímicos do <i>Azospirillum</i>	30
2.9 O Processo de Colonização da Planta por <i>Azospirillum</i>	31
3. Material e Métodos	
3.1 Instalação do experimento, Inoculação e Adubação.....	34
3.2 Coletas das Plantas e Quantificação do Teor de N Total.....	36
3.3 Determinação do Teor de Amônio.....	36
3.4 Componentes da Produção e Teor de Proteínas Totais nos Grãos.....	36
3.5 Análise Estatística.....	37
4. Resultados e Discussão	
4.1 Primeira Avaliação (Início da Antese).....	38
4.2 Segunda Avaliação (Final do Ciclo).....	42
5. Conclusão	51
6. Referencias Bibliográficas	52

Lista de Figuras

- Figura 1. O nitrogênio apresenta uma ciclagem através da atmosfera, à medida que passa da forma gasosa à íons reduzidos, antes de ser incorporado a compostos orgânicos nos organismos vivos representa algumas etapas envolvidas no ciclo do nitrogênio. Fonte: Taiz e Zeiger (2009).....20
- Figura 2. Inter-relação dos processos de assimilação e transporte de N na planta. Observe a transferência de aminoácidos do xilema para o floema e a consequente reciclagem de aminoácidos entre raiz e parte aérea. Fonte: Kerbauy (2008).....21
- Figura 3. Reação catalisada pela nitrogenase. A ferredoxina reduz a Fe-proteína. Acredita-se que a ligação e a hidrólise do ATP à Fe-proteína provoca uma mudança na conformação desta proteína, o que facilita as reações redox. A Fe-proteína reduz a MoFe-proteína e esta última reduz o N₂. Fonte: Taiz e Zeiger (2009).....24
- Figura 4. Esquema representativo da via glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) para assimilação de amônio. Fonte: Fernandes (2006).....26

Lista de tabelas

Tabela 1. Características quanto ao ciclo médio (dias), estatura média (cm), posição das folhas, acamamento e observações de cinco cultivares de trigo. Fonte: COODETEC, 2010.....35

Tabela 2. Massa seca de raiz (g) e teor de nitrogênio (mg kg^{-1}) de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A.brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm^3 de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N) Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010.....38

Tabela 3. Conteúdo de amônio ($\text{mmoles NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$ de raiz) de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A.brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm^3 de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010.....40

Tabela 4. Número de espigas por planta e teor de proteína no grão (%) de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A.brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm^3 de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010.....42

Tabela 5. Número de espigas por planta e teor de proteína no grão (%) de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A.brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm^3 de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010.....43

Tabela 6. Número de perfilhos por planta, número de espiguetas por espiga, comprimento de espiga, massa de 1000 grãos e produção de grãos por vaso de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A.brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm^3 de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010.....44

Tabela 7. Coeficiente de correlação linear de Spearman entre as estimativas dos parâmetros de produção de trigo, [(número de perfilhos por planta (NPP); massa seca de raízes (MSR); teor de NH_4^+ na raiz (TNH₄R); teor de N na parte aérea (TNPA); número de espigas por planta (NEP); comprimento de espiga (CE); número de espiguetas por espiga (NEE); massa de 100 grãos (M1000); teor de proteínas nos grãos (TPG) e produção de grãos por vaso (PGV)]. Os valores relativos às médias de quatro repetições de cinco cultivares de trigo, submetidas à inoculação com *A. brasilense* (AbV5) e adubação nitrogenada. Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010.....48

RESUMO

RESPOSTA DE CULTIVARES DE TRIGO À INOCULAÇÃO EM SEMENTES COM *Azospirillum brasilense*, E À ADUBAÇÃO NITROGENADA EM COBERTURA

O trigo é uma cultura de grande importância para a alimentação humana. Com a intensificação da agricultura e do agronegócio no Brasil, a demanda por fertilizantes nitrogenados tem aumentado substancialmente. A utilização de fertilizantes nitrogenados aumenta o custo de produção e, portanto, o preço final deste cereal. As bactérias diazotróficas podem auxiliar em diversos mecanismos de nutrição nitrogenada em culturas. Além de fixar nitrogênio, esses organismos podem promover o crescimento dessas plantas. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a eficiência agrônômica da bactéria fixadora de nitrogênio (*Azospirillum brasilense*), comparada e associada à adubação nitrogenada na cultura do trigo (*Triticum aestivum*) e definir, dentre cultivares comerciais, qual apresenta melhor desempenho em associação com as bactérias. O experimento foi conduzido sob cultivo protegido no período de maio a setembro de 2010 na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes” em Marechal Cândido Rondon – PR. Foram utilizados cinco cultivares de trigo brasileiros e cultivados na região (CD 104, CD 108, CD 119, CD 120 e CD 150). Os tratamentos foram: inoculação com *A. brasilense* (AbV5); adubação nitrogenada em cobertura; inoculação com *A. brasilense* (AbV5) associado à aplicação de nitrogênio em cobertura e um tratamento sem inoculação e aplicação de nitrogênio, designado como testemunha. O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. As avaliações foram realizadas no estágio de início da antese. Foram avaliadas a massa seca de raízes, o teor de nitrogênio total na parte aérea e teor de amônio nas raízes. No final do ciclo da cultura avaliou-se os seguintes componentes da produção: rendimento de grãos e o teor de proteínas nos grãos. Foram observadas diferenças de resposta entre as cultivares de trigo quando inoculadas com *A.*

brasilense (AbV5) e ou tratamento associado a adubação nitrogenada. A cultivar CD 150 apresentou os maiores teores de nitrogênio na parte aérea, massa de 1000 grãos e teor de amônio nas raízes, quando inoculadas com a bactéria em associação a adubação nitrogenada, cerca de 22,4%, 10,5% e 116,8% de incremento, respectivamente, em relação à adubação nitrogenada. Esses resultados mostram uma interação positiva da bactéria fixadora de nitrogênio e a adubação nitrogenada com a cultivar de trigo CD 150.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, fixação biológica de nitrogênio, bactéria diazotrófica.

ABSTRACT

RESPONSE OF WHEAT CULTIVARS TO INOCULATION WITH SEEDS IN *Azospirillum brasilense*, AND NITROGEN IN COVERAGE

Wheat is an important crop for human consumption. With the intensification of agriculture and agribusiness in Brazil. Therefore, the demand for nitrogen fertilizers has increased substantially. The use of nitrogen fertilizers increases the production cost and the final price of this cereal. Diazotrophs can assist in various mechanisms of nitrogen nutrition in crops. Besides fixing nitrogen, they may promote growth of these plants. The aims of this study were to evaluate the agronomic efficiency of nitrogen fixing bacteria (*Azospirillum brasilense*), compared and associated to nitrogen fertilization in wheat (*Triticum aestivum*), and set among commercial cultivars of wheat, which shows better performance in association with these bacteria. The experiment was conducted in greenhouses in the period from May to September 2010 in the Station of Horticulture and Crop Protected "Prof. Dr. Mario Cesar Lopes" in Rondon - PR. It was used a five wheat cultivars (CD 104, CD 108, CD 119, CD 120 and CD 150). The treatments were: inoculated with *A. brasilense* (AbV5); application of nitrogen associated with inoculation of *A. brasilense* (AbV5); application of nitrogen and a treatment without inoculation and nitrogen application. I was used a randomized design with four replications. It was made two assessments, the first assessment, made in the flowering stage, was evaluated the root dry weight and total nitrogen content. In the second assessment, made at the end of the cycle, was evaluated the following yield components: grain yield and protein content in grains. It was observed difference in response between wheat cultivars when inoculated with *A. brasilense* (AbV5), and/or treatment associated with nitrogen. The CD 150 cultivar presented the highest content of nitrogen in shoots, mass of 1.000 grains and NH_4^+ in roots inoculated with bacteria in combination with nitrogen fertilization, the increase was about 22,4%, 10,5% and 116,8%, respectively, compared to nitrogen fertilization. These

results showed a positive interaction of nitrogen fixing bacteria and nitrogen fertilization with the wheat cultivar CD 150.

Key-words: *Triticum aestivum*, biological nitrogen fixation, inoculation, endophytic bacteria

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 segunda cultura de grãos mais cultivada mundialmente (FAOSTAT, 2009). No Brasil, a estimativa de produção é de 5,03 milhões de toneladas, enquanto a demanda interna é de 10,21 milhões, resultando em um déficit de 5,18 milhões de toneladas, que são supridas com importações (CONAB, 2010). Para a redução dessa dependência de outros países, além do direcionamento de políticas adequadas ao setor, investimentos em tecnologia de produção são necessários.

Dentre as tecnologias a serem estudadas, se destaca a otimização dos insumos utilizados na cultura, visando a redução dos custos de produção. Dentre os insumos utilizados, a adubação nitrogenada representa uma fatia significativa dos custos de produção, e sua aplicação em gramíneas, como o trigo, eleva significativamente o custo de produção do cereal. Sua utilização, porém, é indispensável devido ao nitrogênio se constituir o macroelemento mais limitante na produtividade do trigo, visto que determina o número de afilhos ou perfilhos, sendo essencial na fase de formação dos nós e no início do alongamento do colmo (SALA et al., 2005).

Estima-se em termos mundiais que somente as culturas do trigo, milho e arroz consumam aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura (LADHA et al., 2005). Dessa forma, devido à extensa área ocupada pelos cereais são necessárias pesquisas relacionadas a tecnologias alternativas, que possibilitem a redução da aplicação desses fertilizantes ou sua substituição parcial. Tais tecnologias têm grande importância no que tange à redução dos custos de produção bem como minimização dos impactos ambientais e sustentabilidade.

Nesse sentido, surge o interesse à cerca das bactérias fixadoras de nitrogênio que crescem associadas à essas culturas, pois poderiam suprir ao menos parte das necessidades de nitrogênio através da inoculação. Essas bactérias também conhecidas por promotoras de

crescimento de plantas (BPCPs) podem auxiliar por diversos mecanismos na nutrição inclusive nitrogenada das culturas (SALA et al., 2008).

No entanto, em muitos casos é descrito ocorre ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas, fato que tem sido atribuído ao uso de linhagens e estirpes inadequadas, ineficiência no processo de inoculação, dentre outros fatores.

O trabalho baseia-se na hipótese de que a inoculação de bactérias *Azospirillum brasilense* em cultivares de trigo que se adaptam a elas pode ajudar a suprir a demanda de nitrogênio aumentando a produção deste cereal.

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência agrônômica de bactéria fixadora de nitrogênio (*A. brasilense*), comparada e associada à adubação nitrogenada na cultura do trigo e definir, dentre as principais cultivares comerciais de trigo qual apresenta melhor desempenho na presença dessa bactéria diazotrófica.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 A Cultura do Trigo

O trigo é historicamente um dos cereais de maior importância na alimentação humana. Originário da região do “Crescente Fértil”, localizada na região montanhosa do sudoeste da Ásia, por volta de 7 a 10 mil anos atrás. Trigos ancestrais diplóides *Triticum monococcum* e *Triticum monococcum* spp. *aegilopoides* são ainda encontrados nessa região (HEUN et al., 1997).

O trigo atualmente cultivado, *Triticum aestivum*, foi encontrado em regiões mais distantes do Crescente fértil, num corredor que se estende da Armênia ao sudoeste do mar Cáspio no Irã (DVORAK et al., 1998a). Nesta região *Aegilops taushii* var. *strangulata* é predominante. Supõe-se que hibridações naturais de *Aegilops* com o gênero *Triticum* e uma série de eventos independentes tenham produzido o *T. aestivum*, constituindo o *pool* de genes do trigo comum atual (TALBERT et al., 1998). A espécie atual do trigo comum, *Triticum turgidum* spp *dicoccum*, doadora de maior porcentagem do genoma atual (AABB), foi descoberta em uma série de sítios arqueológicos na Síria que datam 7 mil e 500 ano A.C. (GILL e FRIEBE, 2002).

Atualmente se aceita que o comum é uma espécie hexaplóide ($2n=6x=42$), constituída de três genomas (AABBDD). Segundo Dvorak et al. (1998b), a espécie tetraplóide *T. turgidum* (AABB) possui o genoma A em comum com o *T. monococcum*, e estudos moleculares não diferiram-no de *T. urartu*, sendo este o doador do genoma A para os trigos poliplóides. Já o genoma D foi originado de *Aegilops taushii* pela hibridização de *T. turgidum* e *Aegilops taushii* var. *strangulata* cerca de 7 mil anos atrás. Estudos moleculares comprovaram que o genoma B é originário de *Aegilops speltoides* (WANG et al., 1997).

Botanicamente, o trigo pertence à família Poaceae (NCBI *Taxonomy*, 2008). É uma espécie autógama, com flores perfeitas, que, em condições normais de cultivo, apresenta baixa frequência de polinização cruzada. É uma planta originária de clima frio, porém com a intervenção do homem nos processos de cultivo e adaptação de novas variedades, passou a ser cultivado sob os mais diversos climas. Atualmente cultivam-se no mundo trigos de inverno e

de primavera. Os trigos de inverno, em seu estágio inicial de desenvolvimento, necessitam passar por um período de vernalização, a temperaturas próximas a 0°C, para completar o ciclo reprodutivo. O trigo cultivado no Brasil é de hábito primaveril e a maioria das cultivares é insensível ao fotoperíodo (EMBRAPA/CNPT, 2008).

O trigo ocupa o primeiro lugar em volume de produção mundial. No Brasil, a produção anual oscila de 5 e 6 milhões de toneladas. É cultivado nas regiões Sul, Sudeste (MG e SP) e Centro-Oeste (MS, GO e DF). O consumo anual no país, por outro lado, tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas (EMBRAPA/CNPT, 2008). De acordo com os pesquisadores da Embrapa Trigo, o Brasil oferece área e condições de ser auto-suficiente na produção de trigo. Para isso, seria necessária uma política agrícola adequada, pois a triticultura brasileira ainda enfrenta alguns desafios, entre eles, problema da comercialização do cereal (EMBRAPA/CNPT, 2008).

Na região Sul, o cultivo de trigo constitui uma das principais fontes de renda da produção agrícola no inverno, sendo fundamental no sistema plantio direto para a cobertura vegetal do solo e para a produção de palha que cobrirá o solo durante o cultivo de culturas de verão (WIETHOLTER, 2004).

O trigo prefere regiões de clima mesotérmico, tendendo a temperado, podendo também ser cultivado nas regiões subtropicais, desde que a temperatura elevada seja compensada com aumento em altitude. Fator decisivo na produção é a sensibilidade do trigo no estágio de florescimento à temperatura elevada, a qual pode ocasionar distúrbios fisiológicos durante o enchimento de grãos (LANTMANN et al., 2005).

2.2 Nitrogênio no Solo e na Planta

O nitrogênio é considerado um dos nutrientes que causam maior impacto no desenvolvimento e produtividade das culturas, com conseqüente aumento nos índices de qualidade dos produtos agrícolas quando utilizado. Esse nutriente é indispensável para a formação de proteínas, núcleo-proteínas e outros compostos como aminas, aminoácidos e polipeptídios, sendo então, indispensável para a produção de cereais de alta qualidade (MAGALHÃES, 1979).

A adição do nitrogênio ao solo pode ocorrer via fertilizantes minerais e orgânicos, por meio de água da chuva (as descargas elétricas combinam com N₂ e o O₂ presentes na atmosfera formando óxidos de NO, NO₂) e pela fixação biológica de nitrogênio

(MALAVOLTA, 2006) (Figura 1). Esse nutriente está sujeito a um grande número de processos, principalmente as transformações de formas orgânicas em inorgânicas e vice-versa, podendo resultar em ganhos ou perdas do sistema como um todo (RAIJ, 1991; HAVLIN et al., 2005).

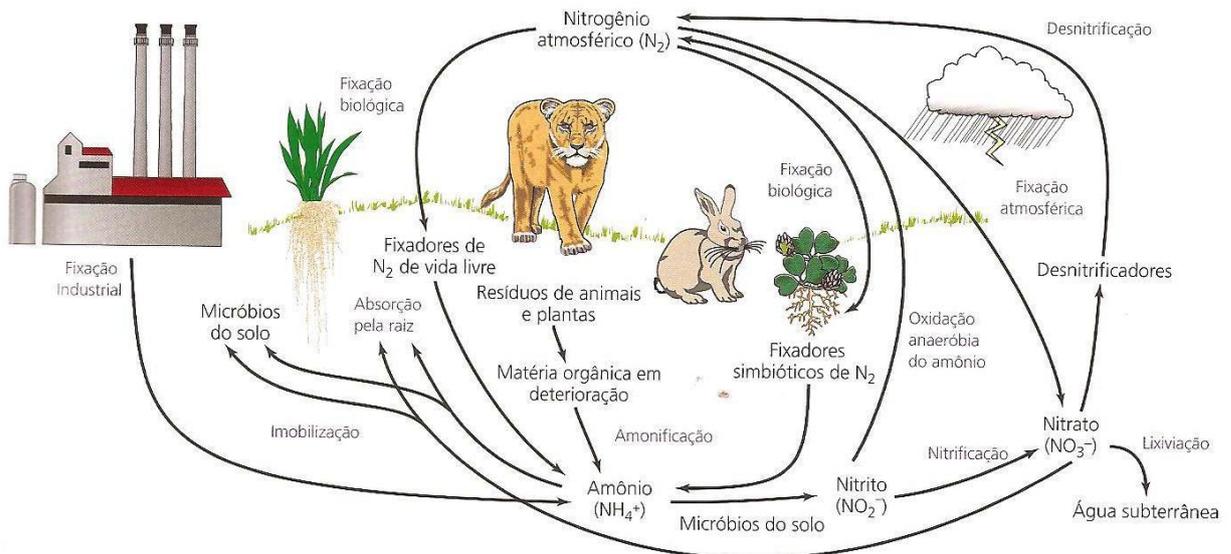


Figura 1. O nitrogênio apresenta uma ciclagem através da atmosfera, à medida que passa da forma gasosa à íons reduzidos, antes de ser incorporado a compostos orgânicos nos organismos vivos representa algumas etapas envolvidas no ciclo do nitrogênio. Fonte: Taiz e Zeiger (2009).

A mineralização do nitrogênio orgânico no solo envolve dois processos microbiológicos distintos: amonificação e nitrificação. A amonificação converte proteínas e aminoácidos em amônia (NH_3). Combinando-se com a água do solo, a amônia forma hidróxido de amônio que ionizando-se, produz NH_4^+ (íon amônio), enquanto a nitrificação converte este em nitrato (CANTARELLA et al., 1992). Outro evento é a denitrificação, onde o elemento volta à atmosfera sob a forma de gás quase inerte (N_2).

Segundo Monteiro (2000), a velocidade do processo de mineralização pode variar com o tempo e, principalmente, com a natureza do resíduo orgânico em decomposição, além de depender da atividade microbiana do solo.

Em áreas tropicais extensivamente manejadas, sem adição de fertilizante nitrogenado, a disponibilidade do nitrogênio depende diretamente da mineralização desse nutriente presente nos resíduos orgânicos. Essa dependência pode resultar em uma mobilização do nutriente, especialmente o nitrogênio, acarretando deficiência e, conseqüentemente, queda de produtividade.

A preferência na absorção de NH_4^+ ou NO_3^- pelas plantas depende da idade da planta, do ambiente e de outros fatores. A taxa de absorção de NO_3^- é usualmente alta, causando aumento no pH da rizosfera. Quando as plantas absorvem altos níveis de NO_3^- , ocorre aumento na excreção de ânions HCO_3^- , OH^- e ânions orgânicos pelas raízes e na adsorção dos cátions Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^+ . A absorção de NH_4^+ ao contrário, diminui o pH da rizosfera porque reduz a absorção de Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^+ e aumenta a dos ânions H_2PO_4^- , SO_4^{-2} e Cl^- . Esse processo ocorre devido à exsudação de H^+ pelas raízes para manter a eletroneutralidade ou o balanço de cargas dentro da planta (HALVIN et al., 2005). Assim, a acidificação é um dos fatores que podem afetar a disponibilidade de ambas as formas de nitrogênio no solo e a atividade biológica na zona radicular.

O nitrogênio, sob forma de NO_3^- , após se absorvido por fluxo de massa pelas raízes das plantas, é reduzido à forma amoniacal e transformado em compostos orgânicos da planta, formando ácido glutâmico e outros aminoácidos. Estes compostos são as unidades básicas para a formação de proteínas, as quais têm importantes papéis funcionais e estruturais nas plantas (MARSCHNER, 1995) (Figura 2).

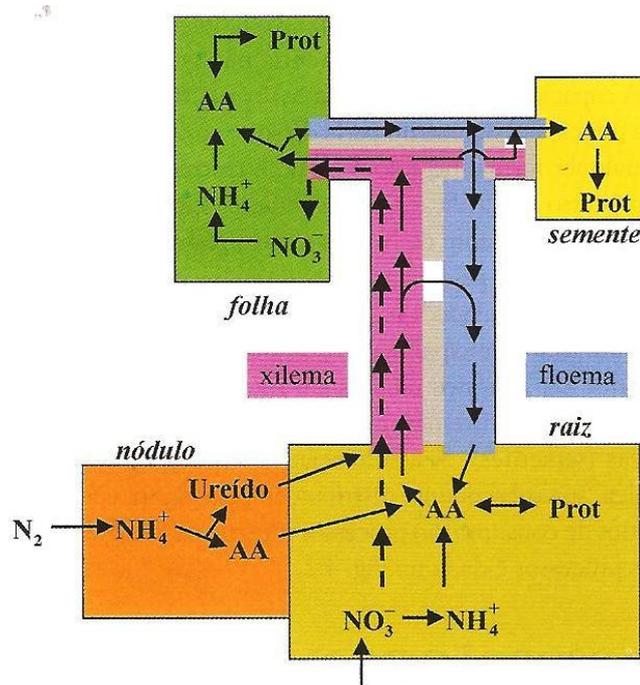


Figura 2. Inter-relação dos processos de assimilação e transporte de N na planta. Observe a transferência de aminoácidos do xilema para o floema e a consequente reciclagem de aminoácidos entre raiz e parte aérea. Fonte: Kerbauy (2008).

A redistribuição do nitrogênio é facilmente realizada na planta, via floema e, conseqüentemente, os sintomas de deficiência desse nutriente aparecem primeiramente nas folhas mais velhas (MENGEL e KIRKBY, 2001). O fornecimento adequado do nitrogênio pelo solo ou pela adição de fertilizantes, como regra, melhora a qualidade dos produtos agrícolas, o excesso, porém pode ser prejudicial (MALAVOLTA, 2006).

O nitrogênio promove alterações na morfologia das plantas e em condições de alto suprimento desse nutriente, ocorre aumento na área foliar, como consequência, a curvatura das folhas é ampliada de modo a interferir na interceptação da luz (MARSCHNER, 1995). O nitrogênio interfere no fluxo de tecidos das plantas, e seu suprimento se reflete no índice de área foliar, na produção de gemas vegetativas, no perfilhamento e no teor de proteínas dos grãos (MALAVOLTA, 2006).

Por ser um nutriente com elevado dinamismo no sistema solo-planta, o manejo adequado do nitrogênio é conhecido como um dos mais difíceis (SANTOS et al., 2003), portanto, é necessário que este seja fornecido à planta em locais e épocas adequadas. Harper (1994), estudando o ciclo do nitrogênio, concluíram que aproximadamente 11% do nitrogênio aplicado é perdido do sistema solo-planta no período de 20 dias após a fertilização.

O custo crescente dos fertilizantes nitrogenados, aliado às elevadas perdas durante a aplicação e absorção pelas plantas demandam práticas de manejo que resultem em alta eficiência de utilização do nitrogênio pelas culturas. No manejo de nitrogênio em sistemas agrícolas deve-se considerar também os riscos ao ambiente, uma vez que este nutriente está sujeito a elevadas perdas por erosão, lixiviação, desnitrificação e volatilização. Desta forma, o manejo ideal da adubação nitrogenada deve ser definido como aquele que permite satisfazer a necessidade da cultura, mas com o mínimo de risco ao ambiente (FERNANDES, 2006).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

Embora constitua quase 80% da atmosfera terrestre, o nitrogênio gasoso, N_2 , é quimicamente inerte a temperatura atmosférica e, diferentemente de outros componentes que ocorrem na natureza. A reação de redução de nitrogênio em amônio – fixação de N - requer uma energia de ativação extremamente alta, pois esta não ocorre espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Na indústria, por exemplo, o processo de fixação de nitrogênio desenvolvido por Haber-Bosh para síntese de amônia emprega temperaturas de 300 e 500° C e pressão acima de 300 atm, sendo utilizados catalisadores a base de ferro (KIM e

REES, 1994) (Figura 3). A principal finalidade da amônia produzida é a fabricação de fertilizantes, sendo que mais de 100 milhões de toneladas é anualmente utilizada na agricultura, uma demanda que implica altos custos financeiros, energéticos e ambientais, pois para a alta temperatura queima-se combustíveis fósseis (NEWTON, 2000).

Na natureza, somente um pequeno número de microrganismos, denominados diazotróficos, ou fixadores de nitrogênio, são capazes de reduzir N_2 a amônio. Esse processo que é chamado fixação biológica de nitrogênio (FBN), é realizado pelo complexo enzimático denominado nitrogenase, que catalisa a reação (EADY e POSTGATE, 1974). Evolutivamente, acredita-se que a FBN tenha se desenvolvido quando as reservas geoquímicas de nitrogênio se tornaram escassas na biosfera. O esgotamento de óxidos de nitrogênio (nitritos e nitratos) pelos organismos teria, provavelmente, limitado seu crescimento ocasionando uma pressão seletiva que favoreceu o aparecimento dos diazotróficos. A capacidade de fixar nitrogênio seria, portanto, um evento relativamente precoce na evolução dos procariontes e anterior ao surgimento da fotossíntese (e conseqüente aumento da concentração de oxigênio livre na atmosfera), uma vez que a nitrogenase é extremamente sensível à desnaturação por oxigênio (NEWTON, 2000).

2.4 Nitrogenase

Desde 1975, Burns e Hardy já haviam proposto que, independentemente dos microrganismos diazotróficos apresentarem um amplo espectro de habitats, todos utilizam uma maquinaria bioquímica para a FBN, que é a nitrogenase.

A nitrogenase é um complexo enzimático composto de duas metalo-proteínas designadas Fe-proteína (dinitrogenase) e MoFe-proteína (dinitrogenase redutase), ambas requeridas para a catálise (DEAN e JACOBSON, 1992; IGARASHI e SEELFELDT, 2003).

Entretanto, os estudos conduzidos por Bishop et al. (1980) e Robson et al. (1986) demonstraram que existem sistemas alternativos de nitrogenase, independentes geneticamente, sendo eles:

1. A nitrogenase clássica ou dependente de Molibdênio (Mo) – codificada por genes *nif*.
2. A nitrogenase dependente por Vanádio (V) – codificada por genes *vnf*.
3. A nitrogenase dependente por Ferro (Fe) – codificada por genes *anf* (EVANS e BURRIS, 1992; TEIXEIRA, 1997).

Considerando a nitrogenase clássica como padrão (Figura 4), em geral, a redução do substrato envolve três tipos básicos de transferência de elétrons: i) redução da Fe-proteína por carreadores de elétrons (ferredoxina), ii) transferência de um único elétron a partir da Fe-proteína para a MoFe-proteína através de um processo dependente de Mg-ATP (no mínimo 2 Mg-ATP/elétrons transferido) e iii) transferência de elétrons para o substrato ligado ao sítio ativo da MoFe-proteína.

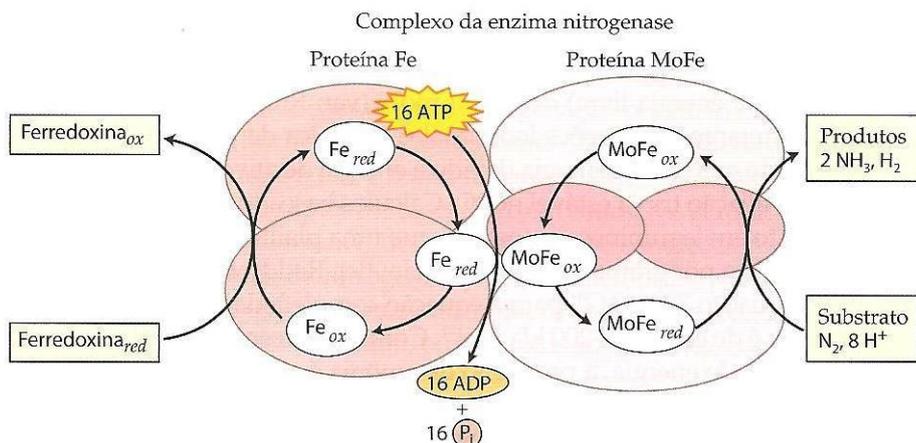
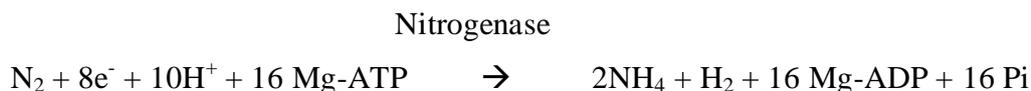


Figura 3. Reação catalisada pela nitrogenase. A ferredoxina reduz a Fe-proteína. Acredita-se que a ligação e a hidrólise do ATP à Fe-proteína provoca uma mudança na conformação desta proteína, o que facilita as reações redox. A Fe-proteína reduz a MoFe-proteína e esta última reduz o N_2 . Fonte: Taiz e Zeiger (2009).

Portanto, em condições ótimas, a estequiometria da reação catalítica responsável pela redução do N_2 a duas moléculas de amônio é usualmente descrita como abaixo ((EADY, 1986; POSTGATE, 1982; SIMPSON e BURRIS, 1984; IGARASHI e SEEFELDT, 2003):



A nitrogenase além de catalisar a redução de N_2 à amônio, reduz prótons a hidrogênio e também pequenas moléculas insaturadas como acetileno, azida e cianeto (KIM e REES, 1994).

2.5 Amônio

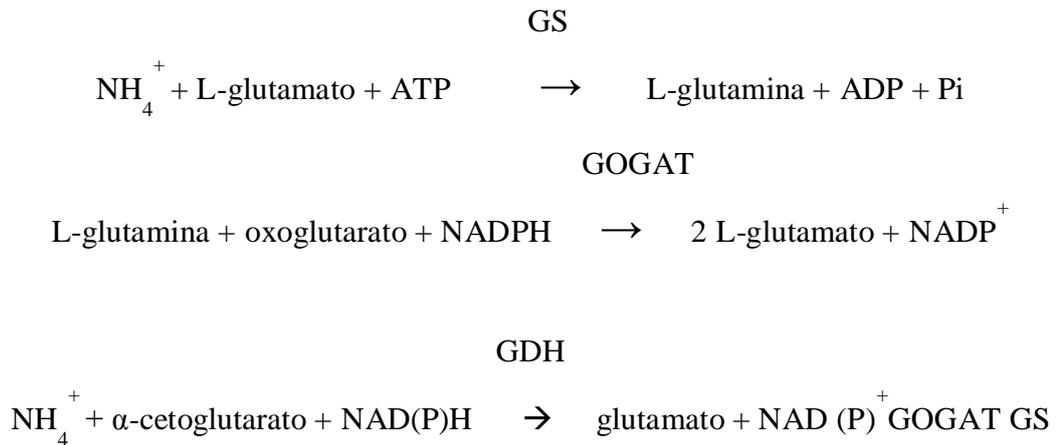
O NH_4^+ é a fonte preferida de nitrogênio inorgânico de muitas plantas (BLOOM, 1997; MALAGOLI et al., 2000). A disponibilidade de NH_4^+ nos solos, geralmente varia menos, tanto sazonalmente quanto espacialmente, comparado a de outras formas nitrogenadas,

particularmente NO_3^- . Conseqüentemente o NH_4^+ pode ser a principal forma de nitrogênio disponível em certas épocas e lugares (EPSTEIN e BLOOM, 2004).

A absorção radicular de NH_4^+ depende de sua única entrada, mediada por um transportador ativo que leva o NH_4^+ através de uma membrana, sem requerer o movimento de outro íon (ULLIRICH, 1987; GLASS et al., 1997). Embora o transporte de NH_4^+ pela membrana não envolva o movimento imediato de outro íon, quando ele é levado para o citoplasma da célula, ocasiona um desequilíbrio eletrostático entre o meio intra e extracelular. Com isso ele faz com que a célula promova um fluxo contrário de cargas positivas, a fim de alcançar a neutralidade. Durante exposições maiores ao íon NH_4^+ , as células assimilam o NH_4^+ , gerando prótons (H^+), que diminuem o pH citoplasmático e estimulam a H^+ -ATPases a bombear prótons para fora da célula, principalmente H^+ , gerando acidez fora da célula (HEDRICH e SCHOEDER, 1989; KURKGJIAN e GUERN, 1989; SERRANO, 1989). A acidez aumentada fora da célula estimula o afluxo de ânions (TYERMAN, 1992). O efluxo de H^+ resultante e afluxo de ânions equilibra o afluxo de NH_4^+ (SMITH; RAVEN, 1979).

Em algumas culturas, existe efeito negativo do íon NH_4^+ sobre o crescimento, que se atribui à necessidade de utilização dos carboidratos produzidos, prioritariamente, para a rápida assimilação do NH_4^+ absorvido, com vistas a evitar sua acumulação e problemas de toxicidade relacionados a alterações no pH celular e desbalanços iônico e hormonal. (BRITTO e KRONZUCKER, 2002).

O amônio obtido pelo processo de fixação de nitrogênio ou captado do meio externo é utilizado na síntese de glutamina e glutamato, (Figura 4), os quais servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas (ARCONDÉGUY et al., 2001). A assimilação de amônio por microrganismos pode ocorrer por duas vias, uma envolvendo a ação seqüencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato-oxoglutarato amino transferase (GOGAT) e outra envolvendo a enzima glutamato desidrogenase (GDH) (MERRICK e EDWARD, 1995; ARCONDÉGUY et al., 2001):



A primeira via (GS – GOGAT) é a principal responsável pela assimilação de amônio em condições limitantes deste composto. A segunda via (GDH) funciona quando a concentração de amônio é alta, pois a GDH possui uma afinidade relativamente baixa para NH_4^+ (MERRICK e EDWARD, 1995). Em *A. brasilense* a via GS-GOGAT é a via predominante de assimilação de amônio independente da fonte de nitrogênio utilizada para crescimento (WESTBY et al., 1987).

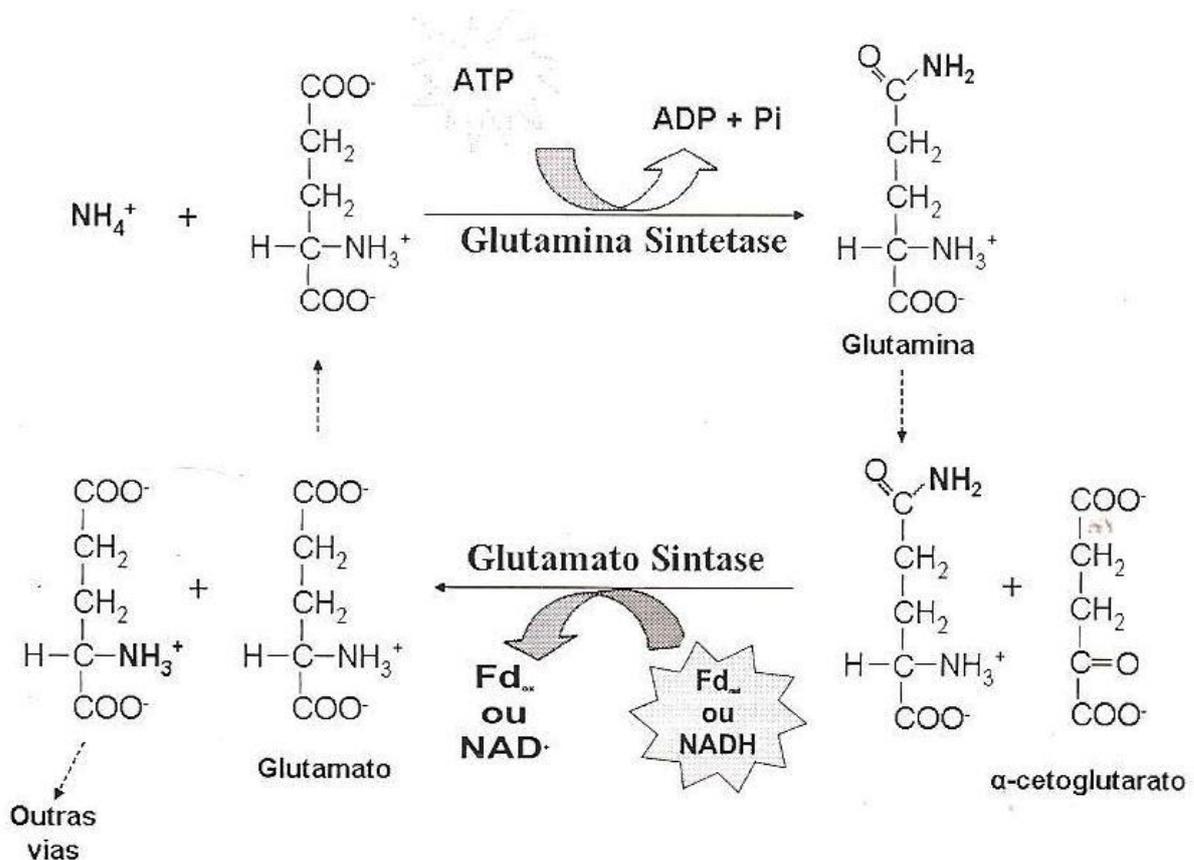


Figura 4: Esquema representativo da via glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) para assimilação de amônio. Fonte: Fernandes (2006).

A assimilação é um processo que envolve muita energia e que varia com níveis de carboidrato nas raízes (REISENAUER, 1978; BLOOM e CALDWELL, 1988). Os níveis radiculares de carboidrato são inversamente correlacionados ao conteúdo de nitrogênio na planta (BROUWER e DEWIT, 1969; TALOUIZTE et al., 1984). Conseqüentemente, níveis radiculares de carboidrato podem servir como um efector positivo da assimilação de NH_4^+ .

2.6 Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas

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. Essa descoberta revolucionou e ampliou as pesquisas sobre todos os aspectos da FBN nas associações entre diazotróficos e não leguminosas, denominadas comumente de simbiose associativa ou fixação de N_2 associativa (BALDANI et al., 1997).

Estima-se que 5% das bactérias procarióticas têm os genes responsáveis pelo processo biológico de fixação de nitrogênio (RAYMOND et al., 2004) sendo estes distribuídos nos cromossomos ou em plasmídeos. A FBN contribuiu com a maior parte do nitrogênio fixado anualmente na Terra: aproximadamente 175 milhões de toneladas, representando cerca de 65% do total, o que faz ser considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os melhores resultados da FBN como potencial biotecnológico têm sido demonstrados para a interação rizobium-leguminosa. A possibilidade de ocorrência de aumentos significativos na disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN para gramíneas, tais como o arroz (BODDEY et al., 1995), cana-de-açúcar (JAMES, 2000), milho, sorgo e trigo (RONCATO-MACCARI et al., 2003) também tem sido descritas. Entre essas culturas, a cana-de-açúcar foi um dos melhores exemplos de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio, devido à eficiência de uma espécie bacteriana que passou a ser isolada desta cultura em condições de baixa adição de fertilizantes nitrogenados utilizada nesta cultura. A *Acetobacter diazotrophicus*, fixa nitrogênio para a planta – estimado em 48% da necessidade de N da cultura (LIMA et al., 1987; OLIVEIRA et al., 2002).

Bactérias diazotróficas que se associam a gramíneas e a cereais possuem a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, sem causar sintomas de doenças, sendo consideradas promotoras de crescimento vegetal. Além de fixarem N₂, produzem hormônios de crescimento como auxinas e giberilinas, que estimulam o crescimento vegetal principalmente das raízes, atuando na maior absorção de nutrientes e água (PEOPLES et al., 1995; FALLIK et al., 1988; DOBBELAERE et al., 1999; LAMBRECHT et al., 2000; LIN et al., 1983). Podem interferir na solubilização de fosfatos ou acelerando processos biológicos como a mineralização (PERSELLO-CARTINEAUX et al., 2003). Também podem agir no crescimento de forma indireta, protegendo a planta de patógenos do solo ou de bactérias patogênicas através de vários mecanismos como produção de sideróforos, quitinases, glucanases e antibiose (WHIPPS, 2001).

Considerando a importância e a urgência do desenvolvimento de produtos que venham a substituir ou diminuir a utilização de energias não renováveis, a pesquisa sobre bactérias diazotróficas especialmente as que a transferência do nitrogênio é eficiente, bactérias endofíticas e rizobactérias) se faz necessária e pode trazer benefícios aos sistemas produtivos e à sustentabilidade da agricultura.

2.7 Uso de *Azospirillum* como Inoculante de Cereais

Dentre os microrganismos diazotróficos encontrados em associações com cereais e gramíneas, as espécies de *Azospirillum* constituem um dos grupos mais bem estudados atualmente, sendo numerosos os trabalhos sobre sua ecologia, fisiologia e genética (BALDANI et al., 1997; BASHAN e HOLGUIN, 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. brasilense*. Atualmente, outras espécies foram descritas, entretanto *A. lipoferum* e *A. brasilense* são as espécies de maior relevância isoladas de cereais (BALDANI et al., 1997). Entre todas as espécies de *Azospirillum* conhecidas, *A. brasilense* constitui a mais caracterizada fisiologicamente através de métodos moleculares, e ainda, é a espécie mais estudada associada a plantas de trigo.

Em condições de campo, foram observados os benefícios e a viabilidade econômica da inoculação de novos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas em genótipos de trigo sob

diferentes doses de nitrogênio. Observou-se ainda que a inoculação da estirpe IAC-AT-8 *A. brasilense* aumentou o nitrogênio acumulado na espiga (RODRIGUES SALA et al., 2008).

Um sumário de experimentos envolvendo a inoculação de *Azospirillum* em gramíneas conduzidos na década de 90 em diversos países tais como: Israel, França, Bélgica, Argentina, Uruguai, México e África do Sul foram publicados por Dobbelaere et al. (2001). Na Bélgica a inoculação de *A. brasilense* estirpe Sp245 aumentou a biomassa seca de plantas de trigo em 62%. Outras revisões também apresentaram resultados positivos do uso desses produtos para a agricultura (KENNEDY et al., 2004; LUCY et al., 2004).

Baldani et al. (1986) sugeriram que a superioridade da estirpe Sp245 de *A. brasilense* nos estudos de inoculação em trigo deve estar relacionada com a seleção inicial e uso de estirpes homólogas. Alguns estudos de inoculação em arroz mostraram resultados promissores para a inoculação de plantas com *Herbaspirillum seropedicae* (aumento de 17 a 19% de nitrogênio derivado de FBN) e *Burkholderia* sp. (11 a 20%) em experimentos de vaso (BALDANI, 1996). Estes resultados indicam que a diversidade da população bacteriana diazotrófica pode auxiliar na efetivação da inoculação. Sumner (1990) descreveu um levantamento de dados sobre aplicação de estirpes de *Azospirillum* em cereais e observou que 32 ensaios apresentaram respostas positivas à inoculação em rendimento de grãos (dados obtidos entre os anos de 1983 a 1985).

De uma maneira geral, 60 a 70% dos experimentos citados por Okon e Labandera-Gonzalez (1994), mostraram incrementos de rendimento com a inoculação, no entanto, somente 5-30% apresentaram respostas estatisticamente significativas. Esta variabilidade pode estar relacionada à interação planta-bactéria, bem como ao limitado conhecimento sobre o potencial de uso destes organismos.

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. Mertens e Hess (1984), utilizando uma estirpe de *Azospirillum* em três anos de experimento de campo, obtiveram aumento variável na produtividade de grãos, 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, tem limitado a produção de um inoculante comercial (DOBBELAERE et al., 2002).

Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas. Há consenso de que o

genótipo da planta é o fator-chave para obtenção dos benefícios oriundos da fixação biológica do N₂, aliado à seleção de estirpes eficientes (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). Os mesmos autores 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 e DÖBEREINER, 1988).

Fazendo-se um balanço dos resultados de experimentos de inoculação com *Azospirillum*, verificaram-se grande variabilidade nos resultados em culturas como trigo, arroz, milho e sorgo, onde a média de incrementos na produtividade está em torno de 20 a 30%. Embora inoculantes comerciais baseados em *Azospirillum* já estejam comercialmente disponíveis em alguns países, a sua aplicação ainda é restrita devido a limitações e a inconsistências no desempenho do processo de colonização da planta pelas bactérias (MORRISSEY et al., 2004).

Segundo Yanii 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 e SICILIANO, 2001). Isso sugere uma adaptação da microbiota, e/ou, uma maior especificidade planta-bactéria, o que torna de extrema importância à pesquisa de novas bactérias endofíticas associativas e de cultivares específicos.

2.8 Aspectos Fisiológicos, Morfológicos e Bioquímicos do *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas, amplamente encontradas em solos de clima tropical e subtropical, e em associação com as raízes de gramíneas de grande

importância econômica, como milho, trigo, arroz e diversas forrageiras, além de outras espécies vegetais. De 30 a 90% das amostras de solo coletadas em todo o mundo contem *A. brasilense* e *A. lipoferum* (DÖBEREINER e DAY 1976).

São bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes e usualmente uniflageladas, apresentando um movimento vibróide característico. *A. brasilense*, *A. irakense*, *A. largimobile* e *A. lipoferum* possuem um padrão flagelar misto, em que um flagelo polar é sintetizado durante o crescimento em meio líquido e vários flagelos laterais são adicionalmente sintetizados durante o crescimento em meio sólido (HALL e KRIEG, 1984). *A. amazonense*, *A. dobereineriae* e *A. halopraeferens* possuem apenas um flagelo polar.

A grande motilidade exibida pelas células, aliada à quimiotaxia positiva para certos ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos (BARAK et al., 1983; REINHOLD et al., 1985; ZHULIN et al., 1988) provavelmente confere a *Azospirillum* uma vantagem seletiva importante sobre os outros microrganismos na rizosfera, onde a disponibilidade de nutrientes é muitas vezes limitada.

O metabolismo de carbono e nitrogênio em espécies de *Azospirillum* é bastante dinâmico e variado. As fontes de carbono preferenciais são ácidos orgânicos como malato, piruvato e succinato, havendo também uma aparente preferência de frutose sobre glicose. Amônio, nitrato, nitrito e aminoácidos, além de N₂, podem servir como fontes de nitrogênio (DÖBEREINER, 1992).

Para *A. brasilense*, salienta-se duas características distintivas, que são sua alta motilidade, evidente mesmo em culturas alcalinas envelhecidas (DÖBEREINER, 1992) e a incapacidade de utilizar glicose como fonte de carbono, devido às ausências de transportador específico na membrana plasmática e de enzimas glicolíticas (GOEBEL e KRIEG, 1984).

Bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas pela sua capacidade de produzir hormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas 'in vitro' (HARTMAN e ZIMMER, 1994). Tem-se verificado que a liberação destes fitohormônios estimula a formação de pêlos radiculares, o aparecimento de raízes secundárias e elevação da superfície radicular quando as plantas são colonizadas por estas bactérias.

2.9 O Processo de Colonização da Planta por *Azospirillum*

As plantas são consideradas um complexo micro ecossistema composto por diferentes habitats e podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias

endofíticas (CHELLIUS e TRIPLETT, 2001; LODEWYCHX et al., 2002). A efetivação da colonização vai depender de aspectos como escolha de estirpe, estado fisiológico da planta e da bactéria, genótipos da planta, aspectos físico-químicos do solo, competição com outros microrganismos, veículo de inoculação entre outros.

Dois tipos de associações radiculares têm sido descritas: uma, em nível de superfície e outra, interna. No primeiro caso, a bactéria coloniza indistintamente toda a superfície radicular, formando pequenos agregados, algumas vezes embebidos em mucigel, e raramente colonizam a superfície dos pêlos radiculares (PATRIQUIN e DÖBEREINER, 1978; UMAIL-GARCIA et al., 1980). No caso de uma associação epifítica, ocorre a colonização pelo *Azospirillum* nos espaços da epiderme e do córtex radicular na zona de alongamento e formação dos pêlos radiculares, os quais muitas vezes não apresentam sinais de ruptura. Segundo Döbereiner (1992), quando uma população se estabelece na rizosfera, uma população interna também se desenvolve especialmente no aerênquima radicular e vasos do protoxilema, onde as concentrações de oxigênio são mais baixas e, assim, favorecem a atividade da FBN.

O processo de ligação da bactéria à radícula ou raiz se realiza em duas etapas: a primeira (fase de adsorção) dura aproximadamente duas horas, é reversível, e provavelmente envolve apenas proteínas; a segunda (fase de ancoramento) dura de 8 à 16h é irreversível e envolve polissacarídeos de superfície (MICHIELS et al., 1991). Ambas as fases são mediadas pela ação do flagelo polar de *Azospirillum*, cuja participação na fase de adsorção é decisiva. Diferentes mutantes de *A. brasilense* desprovidos do flagelo são incapazes de se ligar às raízes de trigo; a desestruturação do flagelo por tratamentos térmicos ou químicos eliminam a capacidade de adsorção da bactéria; flagelos polares purificados são capazes de se ligar às raízes das plantas, ao passo que flagelos laterais não (MICHIELS et al., 1991). Na fase do ancoramento, observa-se semelhança ao processo que ocorre nas espécies de rizóbios (MYLONA et al., 1995), a formação de diversos agregados bacterianos, tem sido sugeridos que o processo de colonização só se torna viável quando um número mínimo de microrganismos está presente nas raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

Algumas espécies do gênero *Azospirillum* possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e são aptos a colonizar todo o interior das mesmas, enquanto outras apenas colonizam a camada de mucilagem ou células do córtex danificadas das raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Parece evidente que bactérias diazotróficas endofíticas possuem vantagens que o interior da planta pode proporcionar, como maior acesso

a fontes de C produzidas pela planta, uma menor pressão de O₂ essencial para o funcionamento da nitrogenase para que ocorra a FBN, ou ainda, pela menor competição com outros microrganismos do solo (LODEQYCKX et al., 2002). Entretanto, em condições de campo a multiplicação e o estabelecimento na rizosfera são importantes para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas associadas às 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, acredita-se que a fixação de N₂ na ecto e endorrizosfera e a liberação de parte de nitrogênio fixado para a planta fosse o principal modo de ação de *Azospirillum spp.* sobre o hospedeiro. Entretanto, os efeitos estimulantes de crescimento de planta ocorreram em vários estudos, onde se observaram respostas positivas à inoculação dessas bactérias (BODDEY e DÖBEREINER, 1988), sem, entretanto, ocorrer incremento no teor de nitrogênio da planta.

As bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Azospirillum* são amplamente estudadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (BASHAN e 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, a 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 e HOGUIN, 1997; ZAIED et al., 2003), e o aumento do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo (BODDEY et al., 1986) e ainda, pela FBN.

3 Material e Métodos

3.1 Localização, Instalação, Inoculação e Adubação do Experimento

O experimento foi conduzido sob cultivo protegido, no período de maio a setembro de 2010, na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido “Prof. Dr. Mário César Lopes” pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon – PR. As coordenadas geográficas da área experimental são: longitude 54° 22’ W e latitude 24° 46’ S, com altitude média de 420 metros.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4, sendo 5 cultivares de trigo (CD 104, CD 108, CD 119, CD 120 e CD 150) e quatro fontes de nitrogênio a cultura (sem adição de nitrogênio sem inoculação com a bactéria, designada como testemunha; inoculação com *A. brasilense* (AbV5), aplicação de nitrogênio em cobertura, e a combinação da inoculação com a adubação nitrogenada em cobertura, com quatro repetições.

Estas cultivares utilizadas apresentam características contrastantes quanto ao ciclo, estatura, posicionamento de folhas e resistência ao acamamento, como apresentado na tabela 1.

O substrato utilizado para condução do experimento foi terra proveniente do Horizonte A classificado como LATOSSOLO VERMELHO eutroférico (LVef) (EMBRAPA, 1999), sendo este predominante na região de Marechal Cândido Rondon, de textura muito argilosa, peneirado em malha de 5 mm. As características químicas do solo foram determinadas antes da instalação do experimento, e apresentaram os seguintes resultados: pH em CaCl₂ = 5,84; M.O. = 16,40 g dm⁻³; P (Melich-1) = 3,31 mg dm⁻³; K (Melich-1) = 0,33 cmol_c dm⁻³; Ca (KCl) = 3,44 cmol_c dm⁻³; Mg (KCl) = 1,65 cmol_c dm⁻³; H + Al = 2,71 cmol_c dm⁻³; Cu = 7,50 mg.dm⁻³; Mn = 0,80 mg.dm⁻³; Fe = 64,90 mg.dm⁻³; Zn = 26,00 mg.dm⁻³; SB = 5,42 cmol_c dm⁻³; CTC = 8,13 cmol_c dm⁻³; Al % = 0,00 e V% = 66,67.

Tabela 1. Características quanto ao ciclo médio (dias), estatura média (cm), posição das folhas, acamamento e observações de cinco cultivares de trigo. Fonte: COODETEC (2010)

Cultivares	Ciclo médio (dias)	Estatura média (cm)	Posição das folhas	Acamamento	Observação
CD 104	124	81	Pendentes	Resistente	Mais plantada no Brasil
CD 108	103	67	Eretas	Resistente	-
CD119	122	85	Intermediarias	Moderad. resistente	Indicada para regiões frias
CD120	120	84	Intermediarias	Moderad. resistente	Indicada para regiões frias
CD150	110	68	Eretas	Moderad. resistente	Descendente da CD 104 e CD 108. Ampla adaptação e alto potencial de rendimentos de grãos

A terra foi adubada antes da semeadura com 300 mg dm⁻³ de fósforo e 150 mg dm⁻³ de potássio sob forma de superfosfato triplo e cloreto de potássio, respectivamente.

Para a inoculação das sementes com *A. brasilense* foi utilizado 2 mL de um cultivo em meio DYGS. O *A. brasilense* usado foi a estirpe AbV5 (FP2), propriedades Na^r Sm^r Estirpe selvagem, SP7 Nif⁺ (PEDROSA e YATES, 1984) para cada 1000 sementes o que correspondeu a 10⁸ UFC por semente. A inoculação foi realizada adicionando-se o inoculante diretamente sobre as sementes, em sacos plásticos e agitadas por aproximadamente 1 minuto para uniformizar a distribuição do inoculante nas sementes. Logo após a inoculação foi efetuada a semeadura.

Foram semeadas seis sementes por vaso e após a emergência foi realizado o desbaste deixando-se apenas quatro plantas. Cada parcela experimental foi constituída de dois vasos com volume de 8 dm³ de terra contendo quatro plantas cada, resultando em 160 vasos.

Nos tratamentos com aplicação de nitrogênio, o mesmo foi aplicado em cobertura, na dose de 30 mg dm³ de uréia em cobertura, equivalente a meia dose recomendada para a cultura do trigo (60 kg ha⁻¹), 30 dias após a emergência.

Os vasos foram molhados diariamente mantendo a terra próxima da capacidade de campo. O controle de pragas e doenças foi realizado de acordo com as necessidades da cultura.

3.2 Coletas das Plantas, Quantificação do Teor de Nitrogênio Total na parte aérea

Ao atingirem o estágio de início da antese (código 62 da escala de ZADOKS et al., 1974) foram coletadas as plantas de um dos vasos que compunham cada parcela experimental. Após a coleta as plantas foram seccionadas em raiz e parte aérea, submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 55 °C por 72 horas, para a determinação da massa seca do sistema radicular. Após a secagem a parte aérea foi triturada em moinho tipo Willy para análises posteriores. Para determinação do teor nitrogênio total na parte aérea das plantas, foram utilizadas amostras de tecido foliar (0,2 g) que foram submetidas à digestão sulfúrica. O teor de nitrogênio total foi determinado por destilação, por arraste de vapores, em aparelho semi-micro-kjeldahl, de acordo com Tedesco et al. (1995).

3.3 Determinação do Teor de Amônio nas raízes

Para determinar o teor de amônio (NH_4^+) nos tecidos das raízes, as amostras de raízes foram maceradas em N_2 líquido em almofariz gelado e deixado evaporar. De cada amostra, 100 mg foram pesadas para ensaio de conteúdo de NH_4^+ (BRAUTIGAM e GAGNEUL et al., 2007). Brevemente, à amostra foi adicionado 500 μL de HCl 100 mM seguido de 250 μL de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por 15 min a 4 °C. As fases foram separadas por centrifugação (16.000 x g, 5 min 8 °C), e o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 25 mg de carvão ativado e homogeneizado. Em seguida, foi centrifugada a 20.000 x g, por 5 min a 8 °C. Para a quantificação de NH_4^+ 200 μL do sobrenadante obtido foi quantificada pelo método do Indofenol (BERTHELOT, 1859). Como padrão foi utilizada uma solução de sulfato de amônio a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4 Componentes da Produção e Teor de Proteínas Totais nos Grãos

Ao final do ciclo da cultura, as espigas das quatro plantas de cada vaso foram colhidas sendo determinados os seguintes componentes da produção: número de perfilhos por planta,

número de espigas por planta, número de espiguetas por espiga, comprimento médio da espiga, massa de mil grãos e a produção de grãos por vaso.

Os grãos obtidos foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 55 °C por 72 horas e trituradas em moinho tipo Willy. Posteriormente as amostras foram submetidas à digestão sulfúrica para determinação do teor de proteínas totais nos grãos, segundo metodologia proposta por Tedesco et al. (1995).

3.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias relativas às cultivares e aos tratamentos (inoculação e adubação nitrogenada) foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As comparações entre os parâmetros de produção de trigo foram realizados pela correlação classificatória de Spearman, segundo Steel e Torrie (1980).

4 Resultados e Discussão

4.1 Primeira Avaliação (Início da antese)

Na avaliação realizada no estágio de início da antese foi verificada interação significativa entre as cultivares de trigo testadas e os tratamentos aplicados, para as variáveis massa seca de raiz e teor de N na parte aérea das plantas (Tabela 2).

Observando os resultados apresentados na tabela 2, no tratamento testemunha a cultivar CD 104 apresentou massa seca de raiz superior às demais, enquanto a cultivar CD 119 foi inferior. Quando utilizado somente o *A. brasilense* (AbV5) as cultivares CD 104 e CD 150 apresentaram produção de massa seca de raiz superior às demais

Tabela 2. Massa seca de raiz (g) e teor de nitrogênio na parte aérea (mg kg^{-1}) de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A. brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm^{-3} de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010

Cultivar	Testemunha	A	N	A + N
	Massa seca de raiz (g)			
CD 104	50,53 Ba	48,54 Ba	63,40 Aa	67,02 Aa
CD 108	36,55 Ab	32,54 Bb	42,35 Ac	30,14 Bb
CD 119	18,36 Bc	33,10 Ab	27,59 Ad	32,40 Ab
CD 120	33,83 Ab	31,50 Ab	33,71 Ad	38,52 Ab
CD 150	40,38 Bb	50,05 Aa	53,81 Ab	38,42 Bb
C.V. (%)	15,34			
Teor de nitrogênio na parte aérea (mg kg^{-1})				
CD 104	18,38 Ab	14,85 Ab	19,52 Ac	20,74 Ac
CD 108	14,24 Db	23,10 Cb	35,68 Bb	48,29 Ab
CD 119	17,08 Ab	18,62 Ab	25,44 Ac	22,64 Ac
CD 120	25,93 Aa	30,80 Aa	33,42 Ab	28,89 Ac
CD 150	29,50 Ca	31,98 Ca	50,90 Ba	62,28 Aa
C.V. (%)	19,81			

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A cultivar CD 104 também apresentou maior massa seca de raiz na presença da adubação nitrogenada (com ou sem a inoculação com *A. brasilense* (AbV5)). A superioridade observada para a cultivar CD 104 provavelmente está relacionada à sua adaptação às características edafoclimáticas da Região Oeste do Paraná, e para o Estado seu plantio é recomendado para todas as regiões, além de esta ser a cultivar mais plantada no Brasil (COODETEC, 2010).

Ainda na tabela 2, no desdobramento das fontes de nitrogênio para cada cultivar, a cultivar CD 108 teve sua massa seca de raiz reduzida na presença de nitrogênio mineral. A cultivar CD 119 respondeu a inoculação com *A. brasilense* (AbV5) e a adubação nitrogenada utilizada. A CD 150 se mostrou responsiva à inoculação com apenas *A. brasilense* (AbV5).

O conjunto de características morfofisiológicas de cultivares de trigo define sua capacidade em competir pelos recursos do meio (RIGOLI et al., 2009). O cultivo de genótipos com elevada capacidade competitiva constitui-se em prática importante na aquisição dos recursos do meio (FLECK et al., 2003). Dessa forma, o desenvolvimento radicular representa uma característica importante no potencial competitivo de uma cultivar, favorecendo uma maior absorção de nutrientes.

Para o teor de nitrogênio na parte aérea das plantas (Tabela 2), no tratamento testemunha e quando foi utilizado somente o *A. brasilense* (AbV5), as cultivares CD 120 e CD 150 foram superiores às demais, quando utilizado a adubação nitrogenada a cultivar CD 150 foi novamente superior às demais, sendo as cultivares CD 104 e CD 119 inferiores. Utilizando a forma associada, a adubação nitrogenada e a inoculação com *A. brasilense* (AbV5), observou-se teor de nitrogênio na parte aérea superior na cultivar CD 150 em relação às demais. A superioridade observada para a cultivar CD 150 sugere uma maior eficiência na transferência do nitrogênio para a parte aérea em relação às demais cultivares.

No desdobramento das fontes de nitrogênio dentro de cada cultivar, o teor de nitrogênio na parte aérea das cultivares CD 104, CD 119 e CD 120 não foram influenciadas. Para a cultivar CD 108 houve aumento no teor de nitrogênio da parte aérea quanto se utilizou adubação nitrogenada associado à inoculação das sementes com *A. brasilense* (AbV5), onde observou-se um incremento de 35,3% em relação à adubação nitrogenada. A cultivar CD 150 também se mostrou a mais responsiva à inoculação com *A. brasilense* (AbV5) quando associada à adubação com nitrogênio mineral, cerca de 22,4% de incremento em relação à adubação nitrogenada (Tabela 2).

Esses resultados estão de acordo com os relatos de Alarim e Mostafa (2009). A transferência de nitrogênio atmosférico para as plantas através da FBN e o crescimento promovido pelas substâncias produzidas por rizobactérias, melhoram o desenvolvimento radicular e, posteriormente é aumentada a absorção de nutrientes pelas plantas de trigo (ALI et al., 2002).

Em relação aos dados obtidos para o teor de amônio (NH_4^+) nas raízes, observa-se na tabela 3 que apesar da cultivar CD 120 não diferir estatisticamente das CD 108 e CD119, esta apresentou um acréscimo considerado no teor de NH_4^+ quando cultivado apenas com o *A. brasilense* (AbV5) (cerca de 116,8% de incremento em relação à adubação nitrogenada), porém observou-se que esse NH_4^+ não foi aproveitado, pois esse acréscimo não se refletiu em plantas com mais massa seca de raiz ou teor de nitrogênio na parte aérea por exemplo. Outros genótipos que responderam a presença do *A. brasilense* (AbV5) com e sem adubação nitrogenada foram o CD 108 (cerca de 170,4% e 104,5% (*A. brasilense* (AbV5) com e sem adubação nitrogenada, respectivamente; em relação à adubação nitrogenada); o CD 150 (cerca de 116,8% e 115% (*A. brasilense* (AbV5) com e sem adubação nitrogenada, respectivamente; em relação à adubação nitrogenada), essas cultivares sim aproveitaram o nitrogênio disponibilizado pela bactéria e além de obterem maiores teores de NH_4^+ nas raízes, obtiveram acréscimos de nitrogênio na parte aérea e no final do ciclo da cultura observou-se a transferência desse nutriente para os grãos, os quais apresentaram maior massa de 1000 grãos. As demais cultivares não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 3. Teor de amônio (mmoles NH_4^+ g^{-1} de raiz) de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A. brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm^{-3} de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010

Cultivar	Testemunha	A	N	A + N
	Teor de amônio (mmoles NH_4^+ g^{-1} de raiz)			
CD 104	6,85 Aa	4,14 Ab	4,26 Aa	6,47 Aab
CD 108	4,91 Ba	7,77 Aab	3,80 Ba	10,27 Aa
CD 119	5,56 Aa	6,12 Aab	5,56 Aa	5,92 Aab
CD 120	4,42 Ba	9,82 Aa	2,71 Ba	4,95 Bb
CD 150	3,35 Ba	4,60 Ab	2,14 Ba	4,64 Ab
C.V. (%)	40,77			

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Evidências indicam que o NH_4^+ é a forma absorvida pelas plantas (LUDEWIG et al., 2002). A absorção de NH_4^+ é feita por sistema bifásico. Quando os níveis de NH_4^+ no meio externo (solução nutritiva ou solução do solo) são baixos, opera o sistema de absorção de alta afinidade (HATS), mediado por uma proteína transportada do tipo uniporte e que mostra cinética de saturação. Isso explica os valores quando não foi utilizado tratamento. Já em concentrações elevadas de NH_4^+ no meio externo entra em funcionamento o sistema de baixa afinidade (LATS), sendo a concentração de 1 mmol L^{-1} de NH_4^+ o limite abaixo do qual opera o sistema de alta afinidade (HATS), e acima do qual opera o sistema de baixa afinidade (LATS) (SOUZA e FERNANDES, 2006)

Porém, o NH_4^+ absorvido pode ser compartimentalizado, como observado por Wang et al (1993). Esses autores trabalhando com arroz observaram que o NH_4^+ foi compartimentalizado nas raízes, sendo acumulado no vacúolo. Os mesmos autores observaram que, em 30 min, cerca de 20% do NH_4^+ absorvido acumulou no vacúolo, enquanto 41% do total permaneceu no citoplasma, 19% foi assimilado e 20% saiu das raízes para o meio externo por efluxo.

Um processo de efluxo contínuo de NH_4^+ é sugerido como uma característica do processo de absorção de N- NH_4^+ por plantas (EPSTEIN e BLOOM, 2004).

Outra explicação para os baixos valores encontrados quando utilizado somente adubação nitrogenada é que a natureza prejudicial do NH_4^+ em acesso exige a sua rápida assimilação, evitando seu acúmulo nos tecidos. Para esse fim os tecidos possuem um eficiente sistema de assimilação que funciona em altas concentrações de NH_4^+ , a enzima glutamina sintetase (GS) incorpora NH_4^+ , formando glutamina, de formação de ligação amidica do NH_4^+ ao grupo α -carboxílico do glutamato, usando energia fornecida pelo ATP (SODEK, 2008).

O acúmulo de NH_4^+ em plantas pode ocorrer tanto devido ao aumento absoluto na disponibilidade de NH_4^+ quanto devido ao aumento relativo do NH_4^+ como consequência de um déficit de esqueleto de carbono, ou seja, a uma deficiência dos cetoácidos para síntese de N-amino e N-amida. É esta a síntese de N-amino/N-amida que reduz o excesso de NH_4^+ livre nos tecidos (SOUZA e FERNANDES, 2006).

Em mandioca fatores que levam ao aumento da concentração interna de NH_4^+ livre, como a maior absorção de íons NH_4^+ , a fotorrespiração e a redução do nitrato, também levam ao aumento da atividade da GS (Glutamina Sintetase) e GOGAT (Glutamato Sintase), enzimas que estão diretamente relacionadas à assimilação do NH_4^+ e a formação de aminoácidos (Cruz, 2001). Neste sentido, algumas culturas estão sendo modificadas para

introduzir genes de GS como meio de aumentar a eficiência da captação de NH_4^+ (MIFLIN e HABASH, 2002).

4.2 Segunda Avaliação (Final do Ciclo)

Os resultados referentes aos componentes da produção das cultivares de trigo, em resposta à inoculação com *A. brasilense* (AbV5) e adubação nitrogenada, são apresentadas nas tabelas 4 a 6.

Nas tabelas 4 e 5 são apresentados os dados relativos ao número de espigas por planta e teor de proteínas nos grãos em função dos tratamentos de inoculação com *A. brasilense* (AbV5) e adubação nitrogenada e a associação dessas (Tabela 4) e em função das cultivares de trigo em estudo (Tabela 5). Os dados para estes parâmetros foram discutidos desta forma pois não apresentaram interação entre os tratamentos e as cultivares.

As maiores médias de número de espigas por planta e teor de proteínas nos grãos foram obtidas com a aplicação de nitrogênio e com a aplicação de nitrogênio associada à inoculação com *A. brasilense* (AbV5) (Tabela 4).

Em estudos realizados por Sala et al. (2007), avaliando isolados de bactérias endofíticas do gênero *A. brasilense* (IAC 8AT), inoculadas na cultura do trigo, estes verificaram que o teor de nitrogênio nos grãos só foi influenciado quando aplicou-se nitrogênio, ou nitrogênio associado as bactérias diazotróficas, concordando com os resultados apresentados neste trabalho quando se avaliou o teor de proteínas nos grãos, que tem relação direta com a disponibilidade de nitrogênio.

Tabela 4. Número de espigas por planta e teor de proteínas nos grãos (%) de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A. brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm^3 de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010

Tratamento	Número de espigas por planta	Teor de proteínas nos grãos (%)
Testemunha	9,25 B	8,39 B
A	9,85 B	8,09 B
N	14,75 A	9,74 A
A + N	15,15 A	10,00 A
C.V. (%)	12,38	12,16

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em relação às cultivares, maior número de espigas por planta foi observado nas cultivares, CD 108, CD 119 e CD 120, e menor na cultivar CD 104. Em relação ao teor de proteínas nos grãos, a cultivar CD 104 foi novamente inferior às demais (Tabela 5).

Considerando-se a comparação entre as cultivares, estas respostas podem estar mais relacionadas a características genéticas, à capacidade de absorção e eficiência do uso do nitrogênio pelos genótipos em questão.

Tabela 5. Número de espigas por planta e teor de proteína no grão (%) de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A. brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm³ de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Unioeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010

Cultivar	Número de espigas por planta	Teor de proteína no grão (%)
CD 104	9,25 C	8,18 B
CD 108	13,50 A	9,22 A
CD 119	12,94 A	9,16 A
CD 120	13,56 A	8,92 A
CD 150	12,00 B	9,81 A
C.V. (%)	12,38	12,16

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto ao número de perfilhos por planta (Tabela 6), no tratamento testemunha, as cultivares CD 104 e CD 150 foram inferiores às demais. Quando foi utilizado somente o tratamento com *A. brasilense* (AbV5) a cultivar CD 104 também apresentou número de perfilhos por planta inferior às demais, todavia, na utilização da adubação nitrogenada, os resultados foram superiores para a cultivar CD 108 em relação às demais. Quando foram utilizados de forma associada, a adubação nitrogenada e a inoculação de sementes com *A. brasilense* (AbV5), observou-se número de perfilhos por planta superior nas cultivares CD 108 e CD 120 em relação às demais.

Tabela 6. Número de perfilhos por planta, número de espiguetas por espiga, comprimento da espiga, massa de 1000 grãos e produção por vaso de cinco cultivares de trigo em função da testemunha, inoculação com *A. brasilense* (AbV5) (A), aplicação de nitrogênio (30 mg dm³ de uréia em cobertura) (N) e com *A. brasilense* (AbV5) + nitrogênio (A + N). Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010

Cultivar	Testemunha	A	N	A + N
	Número de perfilhos por planta			
CD 104	7,00 Bb	7,25 Bb	12,00 Ab	13,50 Ab
CD 108	11,50 Ba	11,00 Ba	17,75 Aa	18,25 Aa
CD 119	12,00 Aa	11,75 Aa	12,50 Ab	12,75 Ab
CD 120	11,50 Ba	10,50 Ba	14,25 Ab	17,00 Aa
CD 150	8,25 Bb	11,25 Ba	14,75 Ab	13,00 Ab
C.V.(%)	18,58			
Número de espiguetas por espiga				
CD 104	16,50 Aa	15,50 Ba	16,50 Aa	17,50 Aa
CD 108	13,75 Ab	14,00 Ab	13,50 Ab	13,25 Ac
CD 119	14,00 Bb	14,50 Bb	16,00 Aa	15,50 Ab
CD 120	14,00 Bb	15,25 Aa	14,00 Bb	13,25 Bc
CD 150	16,00 Aa	15,50 Aa	15,75 Aa	15,75 Ab
C.V.(%)	5,48			
Comprimento de espiga (cm)				
CD 104	13,25 Ba	13,75 Ba	14,50 Aa	14,75 Aa
CD 108	11,25 Bb	11,75 Ab	12,25 Ab	11,00 Bc
CD 119	12,75 Ba	13,25 Ba	14,50 Aa	15,00 Aa
CD 120	12,75 Aa	12,25 Ab	13,25 Ab	13,25 Ab
CD 150	11,25 Bb	12,25 Ab	12,50 Ab	12,75 Ab
C.V.(%)	5,12			
Massa de 1000 grãos (g)				
CD 104	34,86 Bb	38,45 Aa	38,65 Aa	37,23 Ab
CD 108	31,75 Bb	34,98 Ab	35,27 Ab	34,34 Ab
CD 119	37,91 Aa	35,35 Ab	37,04 Aa	35,93 Ab
CD 120	33,80 Ab	33,06 Ab	34,83 Ab	34,73 Ab
CD 150	38,29 Ba	36,40 Ba	38,31 Ba	42,34 Aa
C.V.(%)	5,08			
Produção por vaso (g/vaso)				
CD 104	10,35 Ba	9,66 Bb	20,60 Aa	20,68 Aa
CD 108	10,76 Da	13,15 Ca	18,32 Aa	15,78 Bb
CD 119	9,88 Ba	10,09 Bb	21,90 Aa	21,15 Aa
CD 120	11,18 Ba	11,97 Ba	19,77 Aa	17,84 Ab
CD 150	11,59 Ba	12,29 Ba	20,50 Aa	20,60 Aa
C.V.(%)	9,80			

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

No que diz respeito ao desdobramento da interação, considerando-se os tratamentos exceto a testemunha para cada cultivar, maior número de perfilhos por planta das cultivares CD 104, CD 108, CD 120 e CD 150 foi observado quando foi utilizado a adubação nitrogenada sozinha ou associada ao *A. brasilense* (AbV5), entretanto considera-se que o efeito na associação seja atribuído à adubação nitrogenada no tratamento onde se usa este associado ao *A. brasilense* (AbV5), pois na utilização apenas deste, não foi possível observar aumento ou diferença do tratamento testemunha. A cultivar CD 119 não respondeu a todas as formas de nitrogênio utilizadas (Tabela 6). O perfilhamento das plantas é importante para a produção de trigo e espera-se que o maior número de perfilhos acarrete maior rendimento. Entretanto, o trigo tem por característica desenvolver muitos perfilhos, que, na maioria das vezes, não são férteis, e dessa maneira, o potencial de perfilhamento da espécie não está expresso em rendimento de grãos (TONET, 1999).

Para número de espiguetas por espiga, no tratamento testemunha, as cultivares CD 104 e CD 150 foram superiores às demais. Quando foi utilizada somente inoculação das sementes com *A. brasilense* (AbV5), as cultivares CD 104, CD 120 e CD 150 apresentaram número de espiguetas por espiga superior as demais. Já, quando se utilizou a adubação nitrogenada os resultados foram que as cultivares CD 104, CD 119 e CD 150 foram superiores às demais. Na utilização da forma associada, adubação nitrogenada e a inoculação com *A. brasilense* (AbV5) observou-se número de espiguetas por espiga superior na cultivar CD 104 em relação às demais, o que é mais uma constatação de que o efeito deve ser atribuído à adubação nitrogenada, pois na presença apenas da bactéria essa cultivar não apresentou acréscimos no número de espiguetas por espiga (Tabela 6).

Ainda na tabela 5, no desdobramento das fontes de nitrogênio para cada cultivar, menor número de espiguetas por espiga da cultivar CD 104 foi observada quando houve inoculação com *A. brasilense* (AbV5), enquanto a cultivar CD 108 e CD 150 respondeu a todos os tratamentos. A CD 119 apresentou maior número de espiguetas por espiga na presença da adubação nitrogenada sozinha ou associada à inoculação com *A. brasilense* (AbV5), enquanto a CD 120 se mostrou a mais responsiva à inoculação das sementes com *A. brasilense* (AbV5) (Tabela 6).

Para o comprimento da espiga (Tabela), no tratamento testemunha, as cultivares CD 108 e CD 150 foram inferior às demais. Já, quando na utilização somente inoculação com *A. brasilense* (AbV5) as cultivares CD 104 e CD 119 apresentaram o comprimento da espiga superior às demais. Na utilização de adubação nitrogenada, as cultivares CD 104 e CD 119

foram novamente superior às demais. Quando foram utilizados os tratamentos de forma associada, a adubação nitrogenada e inoculação com *A. brasilense* (AbV5), observou-se comprimento da espiga superior nas cultivares CD 104 e CD 119 em relação às demais, porém da as mesmas cultivares não apresentam incremento quando cultivadas somente com a bactéria, sendo a adubação nitrogenada mais uma vez responsável pelo acréscimo no tratamento associado.

No que diz respeito ao desdobramento das fontes de nitrogênio para cada cultivar, maior comprimento da espiga das cultivares CD 104 e CD 119 foram observadas quando foi utilizado a adubação nitrogenada, sozinha ou associado ao *A. brasilense* (AbV5), enquanto a cultivar CD 108 teve o comprimento de espiga maior na presença do *A. brasilense* (AbV5). A cultivar CD 150 respondeu a todos os tratamentos utilizados, pois apresentaram dados estatisticamente significativos e distintos dos demais.

Para a massa de 1000 grãos (Tabela 5), no tratamento testemunha, as cultivares CD 119 e CD 150 foram superiores às demais. No tratamento que foi feito somente a inoculação com *A. brasilense* (AbV5) as cultivares CD 104 e CD 150 apresentaram massa de 1000 grãos superior às demais. Com a adubação nitrogenada, os resultados nos permitem concluir que a as cultivares CD 104, CD 119 e CD150 foram superiores às demais. Na utilização da forma associada, observou-se massa de 1000 grãos superior para a cultivar CD 150 em relação às demais.

No desdobramento das fontes de nitrogênio para cada cultivar, as cultivares CD 104 e CD 108, responderam a todas as formas de nitrogênio utilizadas, enquanto a CD 150 se mostrou a mais responsiva à inoculação com *A. brasilense* (AbV5) associado ao nitrogênio mineral, onde observou-se um incremento de 10,5% em relação à adubação nitrogenada (Tabela 5).

As características de uma cultivar ou linhagem são resultado de uma série de fatores, como características genéticas, condições edafoclimáticas, técnicas de cultivo entre outros, que influem na expressão da cultivar em estudo (GUTDOSKI e SILVEIRA, 1999).

Guarienti (1996) relatou que a massa de 1000 grãos é uma medida que apresenta forte controle genético, mas também é afetado por condições edafoclimáticas durante a fase de maturação.

Embora alguns genes relacionados à produtividade possam influenciar diretamente nos componentes de rendimento, muitos atuam indiretamente, por meio de processos fisiológicos, interferindo na expressão de outros caracteres das plantas; portanto, se os fatores externos que

prejudicam o desenvolvimento da planta de trigo não forem controlados de maneira correta, isto implicará na redução da produção de grãos (FRANKEL et al., 1981).

Segundo Jenner et al., (1991), para a cultura do trigo, o aumento da massa de grãos, normalmente, está associado a uma maior disponibilidade de nitrogênio durante o período de enchimento de grãos, enquanto uma maior disponibilidade de nitrogênio nas fases iniciais de desenvolvimento da planta promove maior perfilhamento, crescimento foliar e maior número de espiguetas férteis por planta.

Quanto a produção de grãos por vaso, (Tabela 5), no tratamento testemunha e no tratamento com apenas adubação nitrogenada, as cultivares não diferiram entre si. Já quando foi utilizado somente o *A. brasilense* (AbV5) as cultivares CD 108, CD 120 e CD 150 apresentaram produção de grãos por vaso superior às demais, enquanto. Quando foram utilizados de forma associada, a adubação nitrogenada e o *A. brasilense* (AbV5), observou-se produção de grãos por vaso superior nas cultivares CD 104, CD 119 e CD 150 em relação às demais.

No desdobramento das fontes de nitrogênio para cada cultivar, maior produção por vaso das cultivares CD 104, CD 119, CD 120 e CD 150 foi observado quando foi utilizado a adubação nitrogenada sozinha ou associado ao *A. brasilense* (AbV5), enquanto a cultivar CD 108 teve sua maior produção de grãos por vaso na presença da adubação nitrogenada (Tabela 5).

Uma possível explicação seja que as bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas não contribuem com quantidades suficientes de N₂ fixado, para garantir a produtividade máxima destas culturas (ZAMBRE et al., 1984; SAUBIDET et al., 2002; BALDANI e BALDANI, 2005). Além disso, Hallmann et al., (1997), relatam que condições de baixo nível de nitrogênio no solo, como presença de bactérias diazotróficas resultam em uma associação de alto custo energético para a planta, uma vez que essas bactérias são extremamente dependentes de fontes de carbono disponibilizadas pelas plantas, resultando em ausência de desempenhos satisfatórios quanto à produtividade.

Alarim e Mostafa (2009) trabalhando com trigo, *A. brasilense* e variadas doses de N (40, 60 e 80 kg ha⁻¹) constataram que a maior produtividade do trigo foi obtida nas plantas tratadas com a inoculação de bactérias e adubação nitrogenada, particularmente em 60 kg ha⁻¹ N. E ainda os maiores valores de número de espiguetas, comprimento da espiga, peso da espiga principal, rendimento de grãos por planta e índice de grãos foram obtidas também deste tratamento. Outro dado que os autores relatam é que a produção de trigo tratado com 80

kg ha⁻¹ N não diferiram estatisticamente quando comparado com o de 60 kg ha⁻¹ N associado com a bactéria. Assim, a inoculação com bactérias economizou cerca de 20 kg ha⁻¹ de N-fertilizante, mostrando que é economicamente viável o uso dessas bactérias.

Na determinação da resposta do trigo à adubação nitrogenada, é importante considerar o comportamento diferencial entre cultivares e linhagens em relação à eficiência na absorção e utilização do nitrogênio (MIELNICZUK, 1982).

Na tabela 7 são apresentados resultados relativos aos coeficientes de correlação de Spearman entre as estimativas dos componentes da produção de trigo. Verifica-se que de maneira geral existem correlações significativas entre a maioria dos componentes da produção. Contudo em grande parte os valores do coeficiente, apesar de significativo são baixos, mostrando que existe uma interdependência entre os componentes que acabam influenciando a produção de grãos por vaso, para as cultivares de trigo em questão. Vale destacar que na tabela 7 o estudo de correlação foi feito considerando-se as médias das cinco cultivares de trigo e dos quatro tratamentos.

Tabela 7. Coeficiente de correlação linear de Spearman entre as estimativas dos parâmetros de produção de trigo, [(número de perfilhos por planta (NPP); massa seca de raízes (MSR); teor de NH₄⁺ na raiz (TNH₄R); teor de N na parte aérea (TNPA); número de espigas por planta (NEP); comprimento de espiga (CE); número de espiguetas por espiga (NEE); massa de 100 grãos (M1000); teor de proteínas nos grãos (TPG) e produção de grãos por vaso (PGV)]. Os valores relativos às médias de quatro repetições de cinco cultivares de trigo, submetidas à inoculação com *A. brasilense* (AbV5) e adubação nitrogenada. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon – PR, 2010

	MSR	TNH ₄ R	TNPA	NEP	CE	NEE	M1000	TPG	PGV
NPP	-0,049 ^{ns}	0,271 ^{**}	0,486 [*]	0,732 [*]	-0,065 [*]	-0,316 [*]	-0,074 ^{ns}	0,441 [*]	0,501 [*]
MSR	-	-0,004 ^{ns}	-0,105 ^{ns}	-0,146 ^{ns}	0,126 ^{ns}	0,474 [*]	0,236 ^{**}	-0,052 ^{ns}	0,190 ^{ns}
TNH₄R		-	0,273 ^{**}	0,202 ^{ns}	-0,142 ^{ns}	-0,098 ^{ns}	0,077 ^{ns}	0,213 ^{ns}	0,096 ^{ns}
TNPA			-	0,477 [*]	-0,306 ^{**}	-0,049 ^{ns}	0,076 ^{ns}	0,470 [*]	0,438 [*]
NEP				-	0,055 ^{ns}	-0,268 ^{**}	-0,115 ^{ns}	0,531 [*]	0,741 [*]
CE					-	0,472 ^{**}	0,223 [*]	0,009 ^{ns}	0,291 ^{**}
NEE						-	0,412 [*]	-0,132 ^{ns}	0,275 ^{**}
M1000							-	0,209 ^{ns}	0,244 ^{**}
TPG								-	0,531 [*]

* - significativo a 1% de probabilidade, pelo teste Z; ** - significativo a 5% de probabilidade, pelo teste Z; ns - não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste Z.

O teor de N na parte aérea das plantas (TNPA) se correlacionou positivamente, com o número de perfilhos por planta (NPP), número de espigas por planta (NEP), produção de grãos por vaso (PGV) e teor de proteína nos grãos (TPG), sendo os coeficientes de correlação 0,486; 0,477; 0,438 e 0,470, respectivamente. Verifica-se também correlação significativa e positiva entre o TPG e os componentes da produção NPP, NEP e PGV. A partir destes resultados pode-se inferir que o maior teor de nitrogênio na parte aérea das plantas resultaram em plantas mais produtivas com grãos de maior teor de proteínas, observado especialmente para a cultivar CD 150. Estratégias para fornecimento de nitrogênio às plantas na fase vegetativa seja por adubação nitrogenada ou através da fixação biológica de nitrogênio são importantes para obtenção de maiores produtividades e qualidade de grãos.

Ainda na tabela 7 é possível observar que todos os componentes da produção apresentam correlação positiva com a produção de grãos por vaso. Vale destacar o número de perfilhos por planta e número de espigas por planta, pois estes apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,5, sendo estes componentes determinantes para a produção de grãos das cultivares de trigo em questão. Para Di Mauro et al (2000), normalmente, coeficientes de correlação entre 0,40 e 0,75 são considerados de média magnitude.

Cavassim e Borém (1998) estudando a cultura do trigo também verificaram correlações positivas entre número de grãos e comprimento de espigas. Assim, houve tendência de que as plantas com espigas maiores produzirem maior número de grãos. Todavia, isso nem sempre é verdadeiro, já que existe a possibilidade dos grãos terem formato irregular e distribuição pouco densa na espiga.

Vale ainda destacar as correlações significativas e positivas entre a massa seca de raízes com o número de espiguetas por planta e a massa de 1000 grãos, pois estes resultados podem explicar em parte a ação do *A. brasilense* na fixação biológica de nitrogênio e no desenvolvimento do sistema radicular. Isso indica que, mesmo sendo correlações de média e baixa magnitude, se as bactérias diazotróficas não puderem oferecer todo N necessário para a planta, porém se auxiliarem no desenvolvimento da parte radicular - formação de pelos radiculares, aumento na taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular como afirmado por Hartman e Zimmer (1994), já garante um maior número de espiguetas e maior massa de 1000 grãos para a cultura.

Uma questão que vale ressaltar neste estudo é que desde a “Revolução Verde”, todas as cultivares destinadas principalmente para alimentação humana, foram desenvolvidos/selecionados principalmente em função da utilização e resposta a fertilizantes

nitrogenados e não necessariamente em relação a sua capacidade de resposta à FBN (BRUM, 1988; DÖBEREINER, 1992).

Uma das variáveis que contribui para a complexidade das respostas à inoculação é a interação do genótipo da planta e a estirpe inoculada, como constatada pelos resultados. Tal conclusão também foi encontrada nos trabalhos realizados por Salomone e Döbereiner (1996), Scholoter e Hartmann (1998), Baldani e Baldani (2005) e Sala et al.(2007).

5. Conclusões

- Diante dos resultados obtidos pode-se inferir que as bactérias não são capazes de suprir totalmente a demanda do trigo por nitrogênio, sendo necessária à complementação com fertilizante nitrogenado.
- As maiores produções de grãos por vaso foram obtidas com o fornecimento de nitrogênio ou em função da combinação da fertilização nitrogenada com a inoculação das sementes com *A. brasilense* (AbV5), sugerindo a necessidade de complementação de nitrogênio quando se lança mão da inoculação de sementes de trigo com bactérias diazotróficas;
- A cultivar de trigo CD 150 foi a que apresentou melhores resultados na presença do *A. brasilense* (AbV5) associado à adubação nitrogenada;
- Houve diferença de resposta entre as cultivares de trigo quando inoculadas com *A. brasilense* (AbV5), confirmando a interação ente os genótipos de trigo testados e a estirpe de bactéria diazotrófica inoculada nas sementes.

6. Referências Bibliográficas

- ALARIM, S. A.; MOSTAFA, Y, S. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. **Saudi Journal of Biological Sciences** n.16, p. 101–107, 2009.
- ALI, N.A., DARWISH, S.D., MANSOUR, S.M. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* inoculation anhydrous ammonia on root colonization, plant growth and yield of wheat plant under saline alkaline cognition. **Journal Agricultural Sciences**. Mansoura Univ.Egypt, n. 27, p. 5575–5591, 2002.
- 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.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. v. 65, p. 80-105, 2001.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOL, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- 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**, v.77, p.549-579, 2005.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 290 f. 1996. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, 1996.
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of fields grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, p. 35-46, 1986.
- BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. Detection of chemoraxis in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Blatimore, v. 152, p. 643-649, 1983.
- BASHAN, Y.; HOGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, 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.
- BASHAN, Y.; de-BASHAN, L.E. Plant growth-promoting. In: HILLEL, D. **Encyclopedia of soil in the environment**, Oxford : Elsvier, 2005, v. 1, p. 103-115.

BERTHELOT, M. P. E. Violet D'aniline. **Repert Chim Appl**, v.1, p.284. 1859.

BISHOP, P.E.; JARLENSKI, D.M.L.; HETHERINGTON, D.R. Evidence of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**. v. 150, p. 1244-1251, 1980.

BLOOM, A.J. Nitrogen as a limiting factor: Crop acquisition of ammonium and nitrate. In: JACKSON, L.E. (Ed). **Ecology in Agriculture**. Academic Press, San Diego. P. 145-172, 1997.

BLOOM, A.J.; CALDEWELL, R.M. Root excision decreases nutrient absorption and gas fluxes. **Plant Physiology**, v. 87, p. 794-796, 1988.

BODDEY, R. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1, p. 195-209, 1995.

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. 109-12, 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.

BRAUTIGAM, A., D. GAGNEUL, *et al.* High-Throughput Colorimetric Method for the Parallel Assay of Glyoxylic Acid and Ammonium in a Single Extract. **Anal Biochemistry**, v.362, n.1, Mar 1, p.151-3. 2007.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v.159: p.567– 584, 2002.

BROUWER, R.; DEWIT, C.T. A simulation model of plant growth with special attention to root growth and its consequences. In: WHITTINGTON, W.J.(Ed.). **Roots Growth. Butterworths**, London, p. 224-244, 1969.

BRUM, A.J. **Modernização da agricultura: trigo e soja**. Petrópolis :Vozes, 1988. 200p.

BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. New York: Springer-Verlag, p. 189, 1975

CANTARELLA, H.; ABREU, C.A.; BERTON, R.S. Fornecimento de nutrientes pelas matérias orgânicas do solo. In: ENCONTRO SOBRE MATERIA ORGANICA DO SOLO: PROBLEMAS E SOLUÇÕES, 1992, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FCA, 1992. p. 63-122.

CAVASSIM, J.E.; BOREM, A. Correlações em seis populações de trigo (*Triticum aestivum*). **Revista Ceres**, n.45, p. 555-556, 1998.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

Companhia Nacional de Abastecimento - Conab. Acompanhamento da safra brasileira: grãos 2009/2010, Décimo primeiro levantamento - Agosto 2010. Brasília, 2010.

COODETEC. Guia de produtos - Trigo - 2010. Disponível em: <<http://www.coodetec.com.br/guia2010/Segmentado-Trigo.pdf>> Acesso em: 30 jan. 2011.

CRUZ, J.L. **Efeitos de níveis de nitrato sobre o metabolismo do nitrogênio, assimilação do CO₂ e fluorescência da clorofila *a* em mandioca.** 2001. 87f. Tese (doutorado, fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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.

DEAN, D.R.; JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall. p. 763-834, 1992.

DI MAURO, A.O.; CURCIOLO, V.B.; NÓBREGA, J.C.M.; BANZATO, D.A.; SEDIYAMA, T. Correlações entre medidas paramétricas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 35, n. 4, p. 687-696, abr. 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.; TRY, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, F.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARING, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Austrian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRY, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. 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.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In.: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992. p.173-180.

DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. T. (Ed.) **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, Washington, v.2, p. 518-538, 1976.

DVORAK, J et al. The structure of the *Aegilops tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, n. 4, p. 657-670, 1998a.

DVORAK, J. Genome analysis in the *Triticum-Aegilops* alliance. In: SLINKARD, A.E. **Wheat Genetics Symposium**, University of Saskatchewan. Canadá: University Extension Press, vol. 1, p. 8-11, 1998b.

EADY, R. R. Enzymology in free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J.; PUHLER, S. (Ed.) **Nitrogen Fixation**, v.4, p.1-49, 1986.

EADY, R. R.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature EMBO Reports**, London, v. 249, p. 805-810, 1974.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro: CNPS/EMBRAPA, 1999, 412p.

EMBRAPA – NCPT. Centro Nacional de Pesquisa de trigo. **Cultura do trigo**. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm> Acesso em: 10 nov. 2010.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas**. Trad. Maria Edna T. Nunes. Londrina: Editora Planta, 2004.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.M. Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall. p. 1-42,1992.

FALLIK, E.; OKON, Y.; EPSTEIN, E.; GOLDMAN, A.; FISHER, M. Identificacion and qualificacion of IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 21, p. 147-153, 1998.

FAOStat. Base de dados estatísticos da agricultura mundial. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 20 dez. 2009.

FERNANDES, F.C.S. **Dinâmica do nitrogênio na cultura do milho (*Zea mays* L.), em cultivo sucessivo com aveia preta (*Avena strigosa*), sob implantação do sistema plantio direto**. 2006, 198p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FLECK, N. G. et al. Velocidade de estabelecimento em cultivares de arroz irrigado como característica para aumentar a habilidade competitiva com plantas concorrentes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 635-640, 2003.

FRANKEL, O.H.; KNOX, R.B.; CONSIDINE, J.A.. The development of the wheat flower: genetics and physiology. In: EVANS, L.T.; PEACOCK, W.J. **Wheat Science**, Cambridge: Cambridge University Press, p. 167-189, 1981.

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.

GILL, B.S.; FRIEBE, B. Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheat. In: **FAO: BREAD WHEAT**. Roma: FAO, 2002 (FAO Plant Production and Protection Series, nº 30), Roma, 2002.

GLASS, A.D.M.; EMER, Y.; KRONZUCKER, H.J.; SCHIJOERRING, J.K.; SIDDIQI, M.Y.; WANG, M. Y. Ammonium fluxes into plant roots: Energetics, kinetics and regulation. **Zeitschrift für Pflanzennährug und Bodenkunde** v. 160, p. 261-268, 1997.

GOEBEL, E. M.; KRIEG, N. R. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 159, p. 86-92, 1984.

GUARIENTI, E.M. Qualidade industrial de trigo. Passo Fundo: **Embrapa-CNPT**, 1996. 36p. Documentos, 27.

GUTDOSKI, L.C.; SILVEIRA, L. Avaliação reológica de cultivares de trigo para a produção de biscoitos. In: Reunião Nacional de Pesquisa de Trigo, 18., 1999, Passo Fundo. Anais... Passo Fundo: **Embrapa Trigo**. v.2, p.386-390, 1999.

HALL, P. G.; KRIEG, N. R. Application of the immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p. 433-435, 1984.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J. et. al. **Physiology and determination of crop yield**. American Society of Agronomy, 1994. Cap.11A, p.285-302.

HARTMAN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*-Plant Associations (Y. OKON, Ed), p. 15-39. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, 1994.

HAVLIN, J.L.; BEATON, J.D.; TISDALE, S.L.; NELSON, W.L. **Soil fertility and fertilizers, An introduction to nutrient management**, 7ª ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005, 515p.

HEDRICH, R.; SCHROEDER J. I. The Physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v.40: p.539-569, 1989.

HEUN, M. et al. Site of einkon wheat domestication identical by DNA fingerprinting. **Science**, New York, v. 271, n. 5341, p. 1312-1314, 1997.

IGARASHI, R.Y; SEEFELDT, L.C. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. **Critical Review Biochemistry Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 351-384, 2003.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 197-209, 2000.

JENNER, C.F.; UGALDE, T.D.; ASPINALL, D. The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.211-226, 1991.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKES, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crops-farming systems: can their potential for plants growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1229-1224, 2004.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Editora: Guanabara Koogan, 2ª Edição, p. 452, 2008.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, Washington, v. 33, p. 389-398, 1994.

KURKDJIAN, A.; GUERN, J. Intracellular pH: Measurement and importance in cell activity. **Annual Review of Plant Physiology** v. 40, p. 271-303, 1989.

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.

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

LANTMANN, A.F.; CASTRO, C.; WIENTHOLTER, S. O potássio na cultura do trigo. In: YAMADA, T.; ROBERTS, T.L. (Ed.). **Potássio na agricultura brasileira**. Piracicaba: Instituto da Potassa e do Fosfato; Instituto Internacional da Potassa, 2005, p. 723-742. Lavras: Ed UFLA, 2006. 729p.

LIMA, E. et al. Qualification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a ¹⁵N aimed nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 165-170, 1987.

LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R. W. F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, p. 1775-1779, 1983.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potencial applications. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, p. 1-25, 2004.

- LUDEWIG, U; von WIRÉM, N; FROMMER, W.B. uniporte of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. **Journal Biology Chemistry.**, n. 27, p. 13548-13555,2002.
- MAGALHÃES, J.C.A.J. Calagem a adubação para trigo na região do cerrado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n. 50, p. 23-28, 1979.
- MALAGOLI, M.; DAL CANAL, A. et al. Differences in nitrate and ammonium uptake between Scots pine and European larch. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.221, n.1, p.1-3, 2000.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006, 251p.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** London: Academic Press, 1995, 889p.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles pf plant nutrition.** London: Kluwer Academic, 2001, 849p.
- MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 604-622, 1995.
- 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.
- MICHIELS, K.; CROES, C. L.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 137, p. 2241-2246, 1991.
- MIELNICZUK, J. Adubação nitrogenada. In: FUNDAÇÃO CARGIL. **Trigo no Brasil.** Campinas, v. 2, cap. 7, p. 294-301, 1982.
- MIFLIN, B. J.; D. Z. HABASH. The Role of Glutamine Synthetase and Glutamate Dehydrogenase in Nitrogen Assimilation and Possibilities for Improvement in the Nitrogen Utilization of Crops. **Journal Exp Botany**, v.53, n.370, Apr, p.979-87. 2002.
- MONTEIRO, H.C.F. **Dinâmica de decomposição e mineralização de nitrogênio, em função da qualidade de resíduos de gramíneas e leguminosas forrageiras.** 2000. 41p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** Lavras: Ed. UFLA, 2006. 729p.
- MORRISSEY, J. P.; DOW, J. M.; MARK, G. L.; FERGAL O'GARA, Y. Are microbes at the root of a solution to word food production? **Nature EMBO Reports**, London, v. 5, nº 10, p. 922-926, 2004.

NCBI Taxonomy. Base de dados de taxonomia. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>. Acesso em: 05 ago.2010.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; MEWTON, W. E. Nitrogen fixation: From Molecules to Crops Productivity. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 2000.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S. DÖBEREINER, J. BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Ordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 742, 1978.

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntnC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiol. Lett** v.55, p. 95-11, 1984.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: A efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 3-28, 1995.

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

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge. Cambridge Univ. Press. 252p, 1982.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: POTAFOS, 1991, 343p.

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, n° 3, p. 541-554, 2004.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, 162:190-195, 1985.

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.

REISENAUER, H.M.; Absorption and utilization of ammonium nitrogen by plants. In: NIELSEN, D.R.; MACDOLNALD, J. (Eds.). **Nitrogen in the Environment**, Academic Press, New York, v. 2. p. 157-170, 1978.

RIGOLI, R.P. et al . Potencial competitivo de cultivares de trigo em função do tempo de emergência. **Planta daninha**, Viçosa, v. 27, n. 1, mar. 2009 .

ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Second gene (*nifH*) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter choococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein. **The EMBO Journal**. v. 5, p. 1159-1163, 1986.

RODRIGUES SALA, V. M.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. Brasília, v. 32, p. 1099-1106, 2008.

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.

RONCATO-MACCARI, L. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS FEMS Microbiology Ecology**. England, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.42, n.6, p.833-842. 2007.

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.32, n.3, p.1099-1106, 2008.

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**. v.29, n.3, p.345-352, 2005.

SALOMONE, I.G; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology Fertil. Soils**, 21:193-196, 1996.

SANTOS, A.B.; FAGERIA, N.K.; SILVA, O.F.; MELO, M.L.B. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzeas tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 1265-1271, 2003.

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

SCHOLTER, 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.

SERRANO, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 40, p. 61-94, 1989.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmosphere does prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**. v. 224, p. 1095-1097, 1984.

SMITH, E.A.; RAVEN, J.A. Intracellular pH and its regulation. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 30 p. 289-311, 1979.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2ª Ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição mineral de plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa, MG. 2006.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics: a biometric approach**. 2.ed. New York :McGraw-Hill, 1980. 633p.

STEENHOUDT, O; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing and ecological aspects. **FEM Microbiology Ecology**, England, v. 24, p. 487-506, 2000.

SUMNER, M, E. Crops responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**, New York, v. 12, p. 54-123, 1990.

TALBERT, L. E. et al. More than one origin of hexaploid wheat is indicated by sequence comparison of low-copy DNA. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 3, p. 402-407, 1998.

TALOUIZTE, A.; CHAMPIGNY, M.L.; BISMUTH, E. MOYSE, A. Root carbohydrate metabolism associated with nitrate assimilation in wheat previously deprived of nitrogen. **Physiologie Végétale**, v. 22, p.19-27, 1984.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ª Edição, Editora Artmed, 2009.

TEDESCO, M. J.; GIANELO, C.; BISSANI, C. A. **Análises de solo, planta e outros materiais**. Boletim Técnico nº 5, UFRGS - departamento de solos, Porto Alegre, 1995.

TEIXEIRA, K.R. **Bases moleculares e genéticas da fixação biológica de nitrogênio**. Embrapa-CNPAB. Documentos, v. 32, p. 26, 1997.

TONET, G.L. **Resistência de plantas de trigo ao pulgão verde dos cereais**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 3p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 17). Disponível em: www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co17.htm. Acesso em 31/8/2010.

TYERMAN, S.D. Anion channels in plant. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 351-373, 1992.

ULLIRICH, W.R. Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: Mechanism and relationship with nitrate metabolism. In: ULLIRICH, W.K; APARICIO, E.J.; SYRETT, P.J.; CASTILLO, E. (Eds). **Inorganic nitrogen Metabolism**. Springer, New York, p. 32-38, 1987.

UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H.; DAZZO, F. B. Association of *Azospirillum* with grass roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 219-226, 1980.

WANG, G. Z. et al. Plasmon analyse of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*: PCR single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analyses of organellar DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.94, n. 26, p. 14570-14577, 1997.

WANG, M.Y.; SIDDIQ, M.Y.; RUTH, T.J.; GLASS, A.D.M. Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalema. **Plant Physiology**, n. 103, p. 1259-1267, 1993.

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A.; JOSEPH, C. M.; MEEKS, J. C. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **Journal Bacteriology**, v. 169, p. 4211-4214, 1987.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487-511, 2001.

WIETHOLTER, S. Fósforo no solo e a cultura do trigo. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. (Ed.). **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Instituto da Potassa e do Fósforo; Instituto Internacional da Potassa, Piracicaba, 2004, p. 726.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 52, n.1, p. 659- 668, 2001.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; BRUINJI, 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 assessment of its potencial to promote rice grown. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 99-104, 1997.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for growth stages of cereals. **Weed Research**, Oxford, v. 14, p. 415-421, 1974.

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 brasilense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. **Plant and Soil**, v.79, p.61-67, 1984.

ZHULIN, I. B.; TRETYAKOVA, S. E.; IGNATOV, V. Chematoxis of *Azospirillum brasilense* towards compounds typical of plant root exudates. **Folia Microbiologica**, Washington, v. 33, p. 277-280, 1988.