

UNIOESTE - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

ADELINE NEIVERTH

**DESEMPENHO DE GENÓTIPOS DE TRIGO ASSOCIADOS COM *Herbaspirillum*  
*seropedicae* EM RELAÇÃO À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E  
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2011

UNIOESTE – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

ADELINE NEIVERTH

**DESEMPENHO DE GENÓTIPOS DE TRIGO ASSOCIADOS COM *Herbaspirillum seropedicae* EM RELAÇÃO À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Strictu sensu* como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Torres da Costa

Co-Orientadores: Profa Dra Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2011



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



Estado do Paraná

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da Bióloga **Adeline Neiverth**. Aos onze dias do mês de julho de 2011, às 14:00 horas, sob a presidência do Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa, em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Dissertação da Bióloga Adeline Neiverth, discente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Dr. Francisco de Assis Franco (COODETEC), Prof. Dr. José Barbosa Duarte Junior, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo e Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa (Orientador).

Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: **"Desempenho de genótipos de trigo associados com *Herbaspirillum seropedicae* em relação à fixação biológica de nitrogênio e promoção do crescimento vegetal"**.

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Dr. Francisco de Assis Franco.....Aprovada  
Prof. Dr. José Barbosa Duarte Júnior.....Aprovada  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo.....Aprovada  
Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa (Orientador).....Aprovada

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 11 de julho de 2011.

Dr. Francisco de Assis Franco

Prof. Dr. José Barbosa Duarte Junior

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Cristina Gruszka Vendrusco (Co-orientadora)

Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa (Orientador)

*À minha família, que me incentiva a andar no  
caminho da ciência, que investe em mim todas as  
suas forças e expectativas e que, apesar das  
dificuldades, se mantém unida e feliz, dedico!*

## AGRADECIMENTOS

À coordenação do curso de pós-graduação em Agronomia - PPGA.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Antônio Carlos Torres da Costa pela confiança, apoio e sugestões no decorrer do meu mestrado.

À COODETEC, por ceder as sementes e o espaço na casa de vegetação para que eu pudesse realizar meu experimento. Agradeço também aos funcionários da COODETEC, que me auxiliaram no decorrer do experimento.

À UFPR, especialmente o laboratório LABIOGEN, por ceder espaço para minha pesquisa, principalmente às professoras Eliane Vendruscolo e Marise Fonseca dos Santos, por mostrarem os caminhos e as soluções, por me estenderem as mãos nos momentos em que mais precisei. Obrigada pelo carinho e confiança dedicados a mim durante estes dois anos.

Ao professor Vandeir Francisco Guimarães pelo apoio e sugestões.

Aos amigos, em especial, equipe LABIOGEN, Suellen, Dayane, Mariane, Fernando, Isaac, Raquel, Izabel, Kleber, Walkyria, Wagner e Maik, com quem tive uma convivência intensa. Que estavam presentes em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis, tornando-os muito mais fáceis de serem superados. Proporcionaram os momentos de descontração mais divertidos e engraçados. Mostraram-me o verdadeiro significado das palavras amizade e companherismo.

Às queridas amigas e colegas de mestrado Cleuza Montanucci, Juliane Lemos, Patrícia Paro e Cristiane Meinerz. Ao longo desses dois anos passamos por muitos momentos agradáveis, engraçados e outros difíceis. Juntas, conseguimos terminar mais uma etapa de nossas vidas. Descobrimos que nada é tão ruim que não possa ser superado. Obrigada a todas pela amizade, carinho e companherismo.

À minha família querida, onde estão os meus maiores mestres: Pai, Mãe, Walkyria e Andréas. Vocês me ensinaram através de seu exemplo as principais virtudes de um pesquisador: humildade, honestidade e dedicação. Estarei sempre em dívida por todo o apoio, amor, carinho e compreensão que deram a mim durante esses dois anos e durante toda a minha vida. Sem vocês seria impossível enfrentar tudo o que eu enfrentei, dentro e fora do laboratório. Obrigada por confiarem em mim, até quando eu mesma acreditei que não fosse capaz.

À Deus, meu Senhor, em quem confio integralmente, pela orientação nas decisões, pelo sustento na dificuldade e por atender minhas orações na hora exata. Por colocar todas essas pessoas no meu caminho e me mostrar a importância de cada uma delas através dos desafios e alegrias que apareceram durante essa jornada.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	A Cultura do Trigo.....	15
2.2	Aspectos Econômicos da Adubação Nitrogenada .....	16
2.3	Fixação Biológica de Nitrogênio .....	17
2.4	Complexo Nitrogenase .....	19
2.5	Glutamina Sintetase (GS) .....	22
2.6	Micro-organismos Envolvidos na FBN .....	24
2.7	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	25
2.8	Características Genéticas dos Diazotróficos.....	27
2.8.1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 .....	28
2.9	Modo de Colonização por Bactérias Endofíticas.....	29
2.10	Interação Planta-Bactéria .....	30
2.11	Contribuição das Bactérias Diazotróficas no Desenvolvimento Vegetal .....	31
2.12	A Fertilização Nitrogenada na FBN .....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
3.1	Cultivo <i>in vitro</i> das plântulas .....	36
3.1.1	Delineamento experimental.....	37
3.1.2	Avaliação de contaminação .....	38
3.1.3	Co-cultivo <i>in vitro</i> de plântulas de trigo e <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	38
3.1.4	Determinação da massa fresca e seca .....	39
3.1.5	Determinação de nitrogênio total (NT) .....	39

3.1.6	Determinação do conteúdo de amônio .....	39
3.1.7	Atividade da glutamina sintetase (GS) .....	40
3.1.8	Análise microscópica da morfologia de raízes .....	40
3.1.9	Contagem microbiana.....	41
3.1.10	Análise molecular .....	41
3.2	Cultivo em casa de vegetação .....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
4.1	Avaliação <i>In vitro</i> .....	43
4.2	Cultivo em casa de vegetação .....	55
5	CONCLUSÕES.....	65
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Reação da FBN a partir do complexo nitrogenase.....20
- Figura 2. Reações subseqüentes da GS e GOGAT originando glutamina e glutamato. ....23
- Figura 3. Amostragem da senescência na parte aérea das plântulas de trigo após 7 dias em meio líquido em co-cultivo com *Herbaspirillum seropedicae* (A) e não inoculadas (B) onde permaneceram no meio líquido por igual período de tempos. ....46
- Figura 4. Atividade da glutamina sintetase em raiz de plântulas de trigo não inoculadas e inoculadas com *H. seropedicae in vitro*. Colunas seguidas da mesma letra maiúscula, entre tratamentos no mesmo genótipo, e minúscula, entre genótipos no mesmo tratamento, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....48
- Figura 5. Imagem microscópica das raízes de plântulas inoculadas e não inoculadas, de todos os genótipos em aumento de 40 vezes. (C) Plântula não inoculada e (I) Plântula inoculada...50
- Figura 6. Análises de PCR das bactérias *H. seropedicae* epifíticas e endofíticas isoladas de raízes de trigo após 7 dias de co-cultivo. Linha M-Marcador de peso molecular (Ladder 100pb); Linhas de 1 a 8 – bactérias epifíticas aleatoriamente escolhidas de placas de cultivo provenientes dos genótipos avaliados. Linhas de 9 a 13 – bactérias endofíticas. Linha I – inóculo “controle positivo”. B - Branco. ....54
- Figura 7. Atividade da glutamina sintetase em raiz de plantas de cinco genótipos de trigo em função da testemunha, aplicação de nitrogênio ( $142 \text{ kg ha}^{-1}$  em cobertura) (N), inoculação com *H. seropedicae* SmR1 (Hs) e com *H. seropedicae* SmR1 + nitrogênio (N+Hs). Colunas seguidas da mesma letra maiúscula, entre tratamentos no mesmo genótipo, e minúscula, entre genótipos no mesmo tratamento, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....59

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Estudos realizados visando à exploração da interação entre as espécies do gênero *Herbaspirillum* e plantas não-leguminosas. ....27
- Tabela 2. Características quanto ao ciclo, maturação plena (dias), estatura média (cm), acamamento de todos os genótipos de trigo avaliados *in vitro* e em casa de vegetação. ....37
- Tabela 3. Massa fresca de raiz, massa fresca de parte aérea e massa seca de parte aérea em função da inoculação com *Herbaspirillum seropediace* e ausência de inóculo. UFPR, Palotina – PR, 2011. ....44
- Tabela 4. Nitrogênio total na parte aérea e conteúdo de íons amônio em raízes das plântulas inoculadas com *Herbaspirillum seropediace* e não inoculadas. UFPR, Palotina – PR, 2011..46
- Tabela 5. Unidade formadoras de colônia (UFC) *Herbaspirillum seropediace* em plantas inoculadas após 7 dias de co-cultivo *in vitro*. UFPR, Palotina – PR, 2011.....53
- Tabela 6. Massa fresca de raiz, massa fresca da parte aérea e massa seca de parte aérea de cinco genótipos em função da testemunha, aplicação de nitrogênio (142 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura) (N), inoculação com *H. seropedicae* SmR1 (Hs) e com *H. seropedicae* SmR1 + nitrogênio (N+Hs). COODETEC, Cascavel – PR, 2011. ....56
- Tabela 7. Conteúdo de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e nitrogênio total de cinco genótipos de trigo em função da testemunha, aplicação de nitrogênio (142 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura) (N), inoculação com *H. seropedicae* SmR1 (Hs) e com *H. seropedicae* SmR1 + nitrogênio (N+Hs). COODETEC, Cascavel – PR, 2011.....58
- Tabela 8. Massa da planta inteira ao final do ciclo, produção por planta e massa de 100 grãos de cinco genótipos em função da testemunha, aplicação de nitrogênio (142 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura) (N), inoculação com *H. seropedicae* SmR1 (Hs) e com *H. seropedicae* SmR1 + nitrogênio (N+Hs). COODETEC, Cascavel – PR, 2011.....61

## RESUMO

### DESEMPENHO DE GENÓTIPOS DE TRIGO ASSOCIADOS COM *Herbaspirillum seropedicae* EM RELAÇÃO À FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

Os fertilizantes nitrogenados são fontes convenientes de nitrogênio para a cultura de trigo, porém geram altos custos e podem ser poluentes. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma fonte alternativa de nitrogênio por meio das bactérias diazotróficas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de genótipos de trigo brasileiros para a FBN e promoção do crescimento vegetal (PCV) associados com a bactéria diazotrófica *H. seropedicae* SmR1, sob condições *in vitro* e em casa de vegetação. Nas condições *in vitro*, colocou-se plântulas de 8 genótipos de trigo em tubos de ensaio com meio de cultura líquido, co-cultivadas durante 7 dias com  $10^7$  células de bactéria.mL<sup>-1</sup>. O mesmo número de plântulas foi mantido nas mesmas condições, porém sem inóculo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial 8 x 2 com 3 repetições. Analisou-se a massa fresca de raízes, massa fresca e seca de parte aérea, o nitrogênio total (NT), conteúdo de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), contagem microbiana (UFC), Glutamina sintetase (GS), a morfologia das raízes por microscopia e análise molecular das bactérias endofíticas e epifíticas recuperadas após co-cultivo. Em casa de vegetação, foram avaliados 5 genótipos de trigo, onde o delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema fatorial 5 x 4 com 5 repetições, onde: 1 – Testemunha; 2 – Adição de N na forma de ureia, 142 kg ha<sup>-1</sup> de N; 3 – Adição de inóculo contendo *H. seropedicae*, 10<sup>6</sup> células por semente (Hs) e 4 – Adição de ureia + inóculo (N+Hs). Avaliaram-se a massa fresca de raízes, massa fresca e seca de parte aérea, o NT, conteúdo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e a atividade da GS. Como parâmetros agrônômicos avaliaram-se a massa da planta inteira no final do ciclo fenológico, produção por planta e massa de 100 grãos. Como resultados, observou-se *in vitro* a presença de bactérias epifíticas nas raízes de todos os genótipos e presença de bactérias endofíticas não foi verificada nos genótipos CD 104, CD 119 e CD 150. Verificou-se um aumento acentuado de pêlos radiculares nos genótipos CD 105, CD 117, CD 119 e CD120. As cultivares CD 105 e CD 120 pela presença da bactéria endofiticamente associado com o aumento de pêlos radiculares, podem ser as mais promissoras para uma resposta da FBN. As plântulas inoculadas apresentaram senescência precoce. Os níveis de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, GS e NT nas raízes não foram determinantes para a promoção do crescimento vegetal. Os resultados obtidos em casa de vegetação demonstram que, apesar de ter havido interações significativas, os parâmetros não foram determinantes para a definição de um genótipo que apresentasse uma resposta conclusiva a respeito da interação benéfica entre genótipo COODETEC e *H. seropedicae*. No entanto, observou-se uma contribuição a ser mais bem estudada, onde a cultivar CD 120 mostrou indícios de resposta à associação com a bactéria e possível ocorrência da FBN. Não foi observado nenhum efeito negativo da inoculação às plantas. Estudos complementares são necessários para obter respostas quanto às interações destes genótipos com estas bactérias diazotróficas, no processo de colonização, da FBN e da PCV.

Palavras-chaves: *Triticum aestivum*, bactérias diazotróficas, enzima glutamina sintetase, amônio, interação planta-bactéria.

## ABSTRACT

### PERFORMANCE OF WHEAT GENOTYPES ASSOCIATED WITH *Herbaspirillum seropedicae* IN RELATION TO BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND PLANT GROWTH PROMOTION

Wheat is the most important staple food of the world. The increase in grains productivity and protein content is correlated to increase inorganic nitrogen absorption. Usually, urea is the most convenient source of N<sub>2</sub>, but, it causes the increase in crops costs beyond injuries to the environment. The BNF realized by diazotrophic bacteria is an alternative to supplement or replace the nitrogen fertilizers and promote plant growth. The objective of this study was to evaluate the performance of Brazilian wheat genotypes for PCV (plant promoter growth) and BNF by association between diazotrophic bacteria (*H. seropedicae* SmR1) and wheat cultivars under *in vitro* and greenhouse conditions. In *in vitro* experiment, eight wheat plantlets of 8 genotypes were tested in tubes with liquid culture medium and these were co-cultured for 7 days with 10<sup>7</sup> cells.mL<sup>-1</sup>. As control plantlets without inoculum under the same conditions were used. The experimental design was completely randomized in a 2 x 8 factorial with 3 repetitions. We analyzed the fresh mass of roots, fresh and dry weight of shoots, total nitrogen (TN) content of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, microbial counting (CFU), glutamine synthetase activity (GS), the morphology of the roots by microscopy and molecular analysis of epiphytic and endophytic bacteria recovered after co-cultivation. In the greenhouse, it was planted five wheat genotypes. The seeds were placed in pots with 4.5 kg of soil under four treatments: 1 - Control 2 - Addition of N as urea (142 kg ha<sup>-1</sup> of N) 3 - Addition of inoculum containing *H. seropedicae* (10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup>) (Hs) and 4 - Addition of inoculum containing urea + *H. seropedicae* (N + Hs). The experimental design was completely randomized in a factorial 5 x 4 with 5 repetitions. The fresh mass of roots, fresh and dry weight of shoots, NT, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content and GS activity were evaluated. As agronomic parameters were evaluated the whole plant mass at the end of the phenological cycle, yield per plant and weight of 100 seeds. As results *in vitro*, it was observed the presence of epiphytic bacteria on the roots of all genotypes and the presence of endophytic bacteria in genotypes CD 105, CD 108, CD 111, CD 117, CD 120. There was a sharp increase of root hairs in the genotypes CD 105, CD 117, CD 119 and CD 120. The cultivars CD 105 and CD 120 by the presence of endophytic bacteria showed an increase of root hairs, probably it may be the most promising for a response of BNF. The levels of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NT and GS in the roots were not decisive for *in vitro* plant growth promotion. The results obtained in the greenhouse showed significant interactions among parameters, although there were not crucial for the definition of a specific genotype which answers to the interaction. However, there was a contribution to be further studied, where the CD 120 cultivar showed evidence of association with response to the bacterium and possible occurrence of the BNF. There was no negative effect of inoculation to plants. Additional studies are needed to get answers about the interactions of these genotypes with diazotrophic bacteria related to BNF and plant growth promotion.

Keywords: *Triticum aestivum*, diazotrophic bacteria, the enzyme glutamine synthetase, ammonia, plant-bacteria interaction.

## 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o ganho de produção pela cultura do trigo (*Triticum aestivum*), na última metade de século, foi de aproximadamente 1% ao ano, devido aos avanços tecnológicos de melhoramento de algumas cultivares mais produtivas e a adoção de melhores práticas culturais. Porém, a projeção futura é que este ganho anual precisará alcançar perto de 2,5% até 2025, para atender o crescimento demográfico humano (CURTIS et al., 2002).

O aumento na produtividade e no conteúdo protéico deste cereal está diretamente relacionado com o aumento na absorção de nitrogênio inorgânico (SAUBIDET et al., 2002; DÍAZ-ZORITA e FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2008). Isso leva a um aumento proporcional no consumo de fertilizantes nitrogenados uma vez que depois da água, o nitrogênio é o nutriente que mais limita a produtividade de trigo, sendo considerado o elemento mineral mais abundante nas plantas, compondo biomoléculas e inúmeras enzimas (DONATO e ANDRADE, 2004). Porém esses fertilizantes têm alto custo de produção e, estudos comprovam que o emprego desses químicos causa danos ao meio-ambiente, tais como: a emissão de óxidos nitrosos tóxicos, acidificação do solo, eutrofização de lagos e rios, dentre outros (HOWARTH et al., 2000). Esses fatores têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização deste fertilizante sem que haja diminuição da produção.

Uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos é explorar e melhorar a capacidade de gramíneas, como o trigo, para obter nitrogênio através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) gasoso ( $N_2$ ) (SAUBIDET et al., 2002; INIGUEZ et al., 2004). A FBN é mais vantajosa em relação a aspectos ecológicos e econômicos (MUTHUKUMARASAMY et al., 2005). Se a FBN fosse disponível para os cereais (e/ou não-leguminosas) num sistema associativo efetivo com algumas características do sistema simbiótico das leguminosas, isto poderia resultar numa redução significativa no uso de fertilizantes nitrogenados (KENNEDY et al., 1997). Nestes últimos anos este potencial tem sido explorado em não-leguminosas, e os estudos para efetiva aplicação da FBN em cana-de-açúcar são os mais completos (SARAVANAN et al., 2007; BHATTACHARJEE et al., 2008).

Existem alguns estudos com *Herbaspirillum* e com outros diazotróficos, em gramíneas incluindo algumas cultivares brasileiras de trigo (SAUBIDET et al., 2002; INIGUEZ et al., 2004; SALA et al., 2005). Entretanto, a eficiência da FBN principalmente em cultivares brasileiras de trigo e *H. seropedicae* ainda não está muito definida.

Além da FBN, está bem descrito o potencial para promoção do crescimento vegetal (PVC) proporcionado por essas bactérias, principalmente pelo fato destas serem capazes de produzir fitohormônios (ZAKHAROVA et al., 1999; LEE et al., 2004; SALA et al., 2005; BHATTACHARJEE et al., 2008; SPAEPEN et al., 2008).

O interesse de estudos *in vitro* é avaliar unicamente o efeito das bactérias, sem a interferência de fatores ambientais ou a presença de outro micro-organismo que não o de interesse, num ambiente totalmente controlado (KUSS et al., 2007). Estes experimentos, podem ser associados à experimentos em casa de vegetação, realizados para conhecer o comportamento planta/bactéria em ambientes semelhantes aos à campo e verificar se os resultados obtidos *in vitro* se repetem em ambientes de casa de vegetação.

Tanto trigo, quanto a bactéria *H. seropedicae* são alvos de estudos, o que torna relevante o estudo desta interação através da definição dos genótipos que melhor respondem em produtividade e FBN. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de genótipos de trigo nacionais para a FBN e PVC, associadas com a bactéria diazotrófica *H. seropedicae* SmR1, sob condições *in vitro* e em casa de vegetação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Cultura do Trigo

O trigo pertence ao gênero *Triticum*, que é um gênero constituído de um grande número de espécies, das quais algumas se encontram em estado silvestre, enquanto outras somente são conhecidas em estado de cultivo (SOBRINHO e SOUZA, 1983; CURTIS et al., 2002). É uma angiosperma da classe das Liliopsidas, pertencente à ordem Poales e família Poaceae. É uma planta anual, hermafrodita e autógama (MORAES-FERNANDES et al., 2000; BRAMMER et al., 2001).

As espécies podem ser divididas em três grupos de acordo com o número de cromossomos: as diplóides que possuem 14 cromossomos, as tetraplóides com 28 cromossomos e as hexaplóides com 42 cromossomos (BRAMMER et al., 2001).

As espécies diplóides são quase todas silvestres, tais como *T. urartu* Tum., *T. boeoticum* Boiss., *T. monococcum* L. e *T. sinskajae* A. Filat & Kurk. A partir de um cruzamento natural entre uma espécie diplóide de trigo (*T. monococcum*) e uma gramínea silvestre, também diplóide, *Aegilops speltoides*, originou-se um produto diplóide que, após sofrer uma duplicação cromossômica natural, deu origem ao *T. turgidum* L. e outras espécies tetraplóides: *T. dicoccoides* (Korn.) Schweinf., *T. dicoccum* (Schavank) Schubl., *T. karamyshevii* Nevski, *T. jakubzineu* Udacz & Schachm., *T. polonicum* L., *T. ispahanicum* Heslot, *T. durum* Desf., *T. aesthiopicum* Jakubz., *T. turanicum* Jakubz., *T. araraticum* Jakubz. e *T. timopheevi* (Zhuk.) Zhuk. (SOBRINHO e SOUZA, 1983; CURTIS et al., 2002).

As espécies hexaplóides, desconhecidas como formas silvestres e apresentadas unicamente como plantas agrícolas cultivadas, surgiram do cruzamento natural entre uma espécie tetraplóide de trigo (*T. turgidum* Jakubz) e uma gramínea silvestre do gênero *Aegilops*, provavelmente a forma anual diplóide *Aegilops squarrosa*, cujo produto após sofrer uma duplicação cromossômica natural deu origem às formas hexaplóides: *T. zhukovski* Men. & Er., *T. spelta* L., *T. macha* Dek. & Men., *T. sphaerococcum* Pesc., *T. compactum* Host., *T. aestivum* L., *T. vavilovi* (Tum.) Jakubz., *T. petropavlovskiyi* Udacz. & Migusch. e *T. kilarae* Dorof. & Migusch, sendo esta última resultante do cruzamento natural entre as espécies diplóide de trigo *T. timopheevi* (Zhuk) e a gramínea *Aegilops squarrosa* L. (SOBRINHO e SOUZA, 1983).

Os cereais, dentre eles o trigo (*Triticum aestivum*), constituem a base alimentar mais importante da população mundial, ocupando 50% das terras cultivadas (SALA et al., 2005),

ocupando o primeiro lugar em volume de produção mundial. Os maiores produtores de trigo no mundo são a China, a Índia, os EUA, a Rússia e a França (FAOSTAT, 2008). No Brasil a área de trigo cultivada na safra 2010/11 foi de 2,14 milhões de hectares (CONAB, 2011).

O consumo interno brasileiro é de 10,21 milhões de toneladas, sendo que sua produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas, o que deixa o país à mercê dos países produtores para o suprimento deste déficit na produção (CONAB, 2010), tornando assim o 4º maior importador de trigo (CAFÉ et al., 2003). A origem da maior parte do trigo consumido no país, em ordem de quantidade exportada, é Argentina, seguido por EUA, Paraguai, Canadá, Uruguai e Líbano (EMBRAPA-TRIGO, 2008).

O trigo é cultivado nas regiões Sul (RS, SC e PR), Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MS, GO e DF), sendo que cerca de 90% da produção de trigo é oriunda da região Sul do Brasil. O cereal vem sendo introduzido paulatinamente na região do cerrado, sob irrigação ou sequeiro (EMBRAPA/CNPT, 2011).

A espécie *Triticum aestivum* é uma das mais estudadas mundialmente dos pontos de vista científico, tecnológico e econômico. Desde o início do século, inúmeros pesquisadores em vários países, e mais recentemente no Brasil, dedicam-se ao estudo das peculiaridades do sistema genético desta espécie (MORAES-FERNANDES, 1982; PAYNE, 1987; BELL et al., 1995; MORAES-FERNANDES et al., 2000; CAMARGO et al., 2006; FEUILLETA e EVERSOLEB, 2007; MOOLHUIJZEN et al., 2007; PAUX et al., 2008) no melhoramento genético, os quais dedicam-se principalmente ao aumento na produção, resposta ao uso de fertilizantes, qualidade de panificação, arquitetura da planta entre outras características (EMAM e BORJIAN, 2000; FRANCO et al., 2008; MARCHIORO et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009; KHODARAHMI et al., 2010).

## **2.2 Aspectos Econômicos da Adubação Nitrogenada**

O trigo, assim como outros cereais, deverá ter sua produção aumentada com o aumento da população mundial. Até a década de 60, o aumento da produção de grãos se deu ao desenvolvimento de plantas selecionadas que respondiam melhor à utilização de fertilizantes químicos, particularmente os nitrogenados (BODDEY et al., 1995).

A adubação nitrogenada de culturas não-leguminosas é um dos insumos mais caros na agricultura. No entanto, aproximadamente 65% do nitrogênio mineral aplicado é perdido no sistema solo-planta através das emissões gasosas, escoamento, erosão e lixiviação. O impacto

ambiental das perdas variam de: efeito estufa, diminuição do ozônio estratosférico, chuvas ácidas, mudanças no ciclo de N global e a eutrofização das águas superficiais e subterrâneas (BHATTACHARJEE et al., 2008). Além destes problemas ambientais, os sistemas de preparo fazendo uso a longo prazo de ureia pode esgotar os teores de matéria orgânica nos solos (WAIRIU e LAL, 2003). Outro fator importante no elevado custo de produção do fertilizante nitrogenado está na sua dependência de combustível fóssil para sua síntese, o que o torna alvo das crises do petróleo (RAPPEL e LOIOLA, 1993).

Deste modo, o custo de produção e conservação ambiental tem alavancado a busca de meios a serem empregados para reduzir a dependência da fertilização, especialmente a nitrogenada na agricultura (BHATTACHARJEE et al., 2008). Neste contexto, ocorreu um aumento nos estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio, a partir da década de 70, onde pesquisadores passaram a se empenhar em compreender a FBN (MARX, 2004). Os estudos de novas tecnologias que venham oferecer independência de fertilizantes nitrogenados permitirão o desenvolvimento de uma agricultura que possa garantir o abastecimento de grãos no futuro, com menor manipulação gênica (BHATTACHARJEE et al., 2008) e o melhor aproveitamento do N atmosférico a partir da FBN (GRAHAM e VANCE, 2003).

O N é essencial para o desenvolvimento dos vegetais e constitui um macronutriente limitante para a produtividade das plantas de interesse agrônomo (TAIZ e ZEIGER, 2009). No trigo, ele é fundamental na produtividade, visto que determina o número de afixos, sendo essencial na fase de formação dos nós, no início do alongamento (SALA et al., 2005).

A importância dos fertilizantes nitrogenados para as culturas não-leguminosas, como o trigo e arroz, é devido ao alto custo que esses fertilizantes representam e da extensa área ocupada por esses cereais (aproximadamente cinco vezes a das leguminosas). Um dos objetivos para a agricultura sustentável é o aproveitamento eficiente de N atmosférico, a FBN associada a essas culturas torna-se de extrema importância, mesmo que apenas parte de suas necessidades de N possa ser suprida, pois assim amenizaria grande parte dos infortúnios que rodeiam essa cultura de grande importância sócio-econômica (SALA et al., 2005).

### **2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio**

O N está presente de muitas formas na biosfera. A atmosfera terrestre contém aproximadamente 79% de N<sub>2</sub>, destes 0,04% são encontrados na ecossfera terrestre de forma

combinada, onde 57% estão na forma orgânica e 43% na forma inorgânica (KERBAUY, 2008).

Muitos compostos bioquímicos presentes nas células vegetais possuem N, por exemplo, é encontrado nos nucleosídeos fosfato e nos aminoácidos que formam a estrutura dos ácidos nucléicos e das proteínas, respectivamente. Nas plantas, apenas o oxigênio, o carbono e o hidrogênio são mais abundantes que o N. A maioria dos ecossistemas naturais e agrários apresentam um expressivo ganho na produtividade após serem fertilizados com N inorgânico, comprovando a importância desse elemento (TAIZ e ZEIGER, 2009).

A maior parte do N atmosférico não está disponibilizado diretamente aos organismos vivos. Sua obtenção requer a quebra da ligação tripla entre dois átomos de nitrogênio para a produção de amônia ( $\text{NH}_3$ ) ou nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Estas reações são conhecidas como fixação de nitrogênio que podem ser realizadas por processos industriais (fabricação de fertilizantes nitrogenados) ou por processos naturais (TAIZ e ZEIGER, 2009). Na natureza existem três processos naturais que são responsáveis pela fixação de nitrogênio: os relâmpagos (8%) e as reações fotoquímicas (2%), que fixam  $\text{N}_2$  na forma de  $\text{HNO}_3$  e a FBN realizado por bactérias ou algas azuis (90%) em que fixam  $\text{N}_2$  em amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (SCHLESINGER, 1997). A adição do N no solo pode ocorrer tanto através de fertilizantes químicos, processos industriais, ou por meio da água da chuva e da própria FBN por processos naturais (MALAVOLTA, 2006).

No solo, o N entra no ciclo biogeoquímico, no qual pode passar por várias formas orgânicas ou inorgânicas antes de retornar à forma molecular (RAIJ, 1991; HAVLIN et al., 2005; KERBAUY, 2008). O N orgânico é mineralizado no solo por dois processos microbiológicos: a amonificação, que é o catabolismo da matéria orgânica em  $\text{NH}_4^+$  (por bactérias e fungos) e a nitrificação que é a oxidação bacteriana do  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NO}_2^-$  e este em  $\text{NO}_3^-$ , pela *Nitrossomonas* spp. e *Nitrobacter* sp., respectivamente (SCHLESINGER, 1997; TAIZ e ZEIGER, 2009). Este último processo ocorre muito rapidamente e graças às condições do solo, que inibem a atividade dessas bactérias, pH muito ácido e concentrações elevadas de fenóis ou anoxia, a  $\text{NH}_3$  não é oxidada e algumas plantas conseguem absorver nesta forma (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Os íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , gerados pela FBN ou pela decomposição de matéria orgânica do solo, tornam-se objetos de intensa competição entre plantas e micro-organismos. Para permanecerem competitivas as plantas desenvolveram mecanismos para capturar rapidamente esses íons. Suas raízes, tanto de monocotiledôneas como dicotiledôneas, apresentam regiões que estão em constante divisão, alongamento e diferenciação celular, resultando assim, em

altas taxas de absorção de nutrientes, dentre eles o  $\text{NH}_4^+$  e o  $\text{NO}_3^-$ . Por exemplo, o alongamento celular depende do acúmulo de potássio, cloro e  $\text{NO}_3^-$ ; já o  $\text{NH}_4^+$  é fonte preferencial de N para sustentar a divisão celular, pois consome menos energia que a assimilação de  $\text{NO}_3^-$ . Além dessas características, as raízes ainda possuem a presença de pêlos radiculares, responsáveis por aumentar a área de superfície de absorção de água e solutos, resultando na forte demanda de nutrientes nesses tecidos (TAIZ e ZEIGER, 2009).

As bactérias fixadoras de nitrogênio, que convertem o  $\text{N}_2$  em  $\text{NH}_4^+$ , são denominadas diazotróficas: organismos capazes de crescer com  $\text{N}_2$  atmosférico como única fonte de N. Algumas destas bactérias podem estar em íntima associação com plantas de interesse econômico (JAMES e OLIVARES, 1998).

Existem três tipos de organismos diazotróficos: os de vida livre, os que vivem associados a outros organismos e os que vivem em simbiose com outros organismos. A mais eficiente relação desenvolvida foi a simbiose de certas bactérias com plantas da família Leguminosae, em que o procarioto fornece a planta hospedeira o N fixado em troca de nutrientes e carboidratos. Esse processo ocorre nos nódulos formados nas raízes dos vegetais contendo bactérias fixadoras (PERIN, 2007).

As recentes evidências de uma FBN significativa em espécies de gramíneas de grande importância econômica, particularmente a cana-de-açúcar, arroz e gramíneas forrageiras, têm gerado grande interesse na fixação de  $\text{N}_2$  em não-leguminosas de preferência gramíneas (BODDEY et al., 1995; KENNEDY et al., 1997; JAMES, 2000).

Diferentemente da maioria dos estudos nos anos 1960 a 1980, que em grande parte dos pesquisadores centravam sua atenção sobre as bactérias da rizosfera como prováveis fontes de N fixado, grande parte do recente interesse centrou-se sobre a possibilidade de que bactérias dentro das próprias plantas, bactérias diazotróficas endofíticas (DÖBERAINER et al., 1995), seriam responsáveis pela fixação de  $\text{N}_2$  observado (JAMES, 2000).

## **2.4 Complexo Nitrogenase**

A fixação de N foi demonstrada para procariontes de vida livre ou em associação com eucariontes. Dos micro-organismos fixadores de N de vida livre, alguns dependem de suas próprias capacidades fotossintéticas, como as cianobactérias, ou do exsudato das plantas para obter os esqueletos de carbono (açúcar) e energia. As bactérias associadas às plantas retiram o carbono e a energia destas associações. Energia que deve atender a necessidade de reduzir o



O complexo MgATP liga a Fe-proteína reduzida, mudando seu estado conformacional, levando a interação com a MoFe-proteína, transferindo seus elétrons com concomitante hidrólise do MgATP. O MgADP é trocado por novo MgATP e o processo se repete até que suficiente número de elétrons reduza a MoFe-proteína acoplada ao substrato. Embora a Fe-proteína seja um doador de elétrons à MoFe-proteína obrigatório, o doador de elétrons à Fe-proteína é menos conservado entre espécies, particularmente na composição do centro Fe-S (HALBLEIB e LUDDEN, 2000).

O controle da expressão desses genes varia de acordo com as diferentes adaptações e necessidades fisiológicas de cada micro-organismo (COUTO, 2005). Na maioria dos procariontes diazotróficos, a nitrogenase é regulada à nível transcricional pelo O<sub>2</sub> e por íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> do ambiente. O oxigênio é um potente agente oxidante, que compete pelo potencial redutivo do complexo nitrogenase, desta forma, a nitrogenase é dita como particularmente sensível à presença de O<sub>2</sub>. Assim sendo, a transcrição destes genes é reprimida na presença deste ou, em alguns organismos aeróbicos, seu processo de respiração deve ser acelerado para que haja o consumo de O<sub>2</sub> (HALBLEIB e LUDDEN, 2000).

Os mesmos autores relatam ainda, que é vantajoso também reprimir a síntese do complexo nitrogenase quando o nível de N fixado já é suficiente para atender a demanda metabólica, entretanto o grau com que o sistema é afetado pelo íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é diferente para cada particular diazotrófico.

A rápida disseminação da amônia formada, como há dentro do nódulo simbiótico, leva a uma nitrogenase pouco sensível, diferentemente das diazotróficas de vida livre que são sensíveis à amônia. O produto do gene *nifA* é descrito para maioria dos diazotróficos como ativador da transcrição (HALBLEIB e LUDDEN, 2000).

A FBN é um processo energeticamente dispendioso, portanto necessita de uma regulação de curto prazo e reversível. É descrito para inúmeros diazotróficos, a regulação a nível pós-transcricional por modulação covalente, de ADP-ribosilação, em um resíduo arginil, que desativa uma das subunidades da dinitrogenase redutase. A re-ativação ocorre pela quebra da ligação glicosídica. Envolvidas neste processo estão, respectivamente, as enzimas dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DRAT) e dinitrogenase redutase glicohidrolase (DRAG). A enzima DRAT responde a formas de N fixado, como íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, e a mudança do dia para noite. Entretanto essa não é a exclusiva regulação de curto prazo, descrita para a resposta da nitrogenase quando a bactéria está em presença de fontes de N solúveis (HALBLEIB e LUDDEN, 2000).

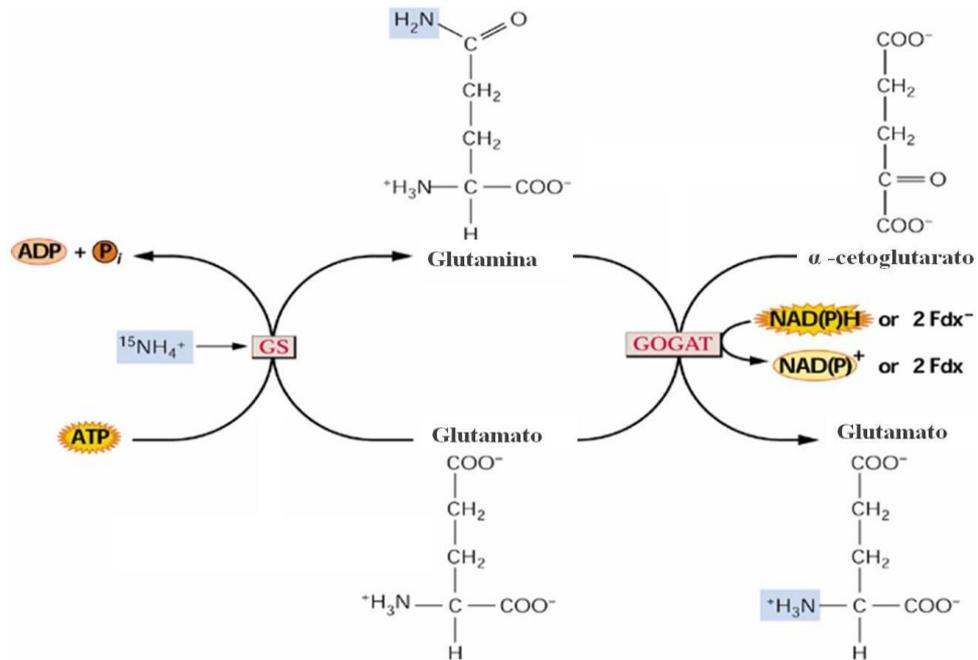
Para *Azospirillum brasiliense* sp7 a redução de um ambiente micro-aeróbico para totalmente anaeróbico ativa a DRAT e o retorno às condições microaróbias ativa a DRAG, assim como também a presença e ausência de N fixado. *Rodospirillum rubrum* e *Rhodobacter capsulatus* sofrem o mesmo tipo de regulação quando ocorre o esgotamento de energia, tão importante para a nitrogenase, especialmente relacionada ao período noturno (ZHANG et al., 1993). Este fenômeno também se aprecia para cianobactérias não heterocítica, pois fazem fotossíntese durante o período diurno, mantendo sua nitrogenase inativa e à noite, usam seus estoques de energia para atividade da nitrogenase que se torna ativa (BURRIS, 1991). Entretanto, também é descrito para *A. brasiliense* sp7, uma regulação ainda mais rápida que a regulação pós-transcricional, em resposta ao íon  $\text{NH}_4^+$  e que esta poderia estar relacionada à razão ATP/ADP, nível de  $\text{O}_2$  dissolvido ou ainda a mudanças no potencial de membrana. Para *A. brasiliense* e *R. rubrum* o sistema DRAT/DRAG é o mais significativo na regulação da atividade nitrogenase em resposta ao íon  $\text{NH}_4^+$ .

Em *H. seropedicae* SmR1 por não apresentar os genes para DRAT e DRAG ou sequer depender da razão ATP/ADP para a tácita inibição de curto prazo sofrida de sua nitrogenase em presença de compostos nitrogenados, foi proposta a ocorrência de uma pequena variação no potencial de membrana especialmente em função de íons amônia, glutamina e glutamato, como agentes da diminuição da atividade nitrogenase nesta bactéria (KLASSEN et al., 1997).

## 2.5 Glutamina Sintetase (GS)

Está bem estabelecido na literatura que plantas superiores fazem assimilação de nitrogênio inorgânico em orgânico através da reação catalisada pela enzima Glutamina sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2). A GS catalisa a condensação dependente de ATP de íons amônio com ácido glutâmico produzindo glutamina (CREN e HIREL, 1999; BARKER e BRYSON, 2007; TAIZ e ZEIGER, 2009). Esta enzima pode funcionar associada a uma enzima denominada Glutamato-oxaloacetato aminotransferase, que pode ser ferredoxina-dependente ou NADH dependente em plantas, também conhecida como glutamato sintase (Fed-GOGAT, E.C. 1.4.7.1 ou NADH-GOGAT, E.C. 1.4.7.1.4). Esta enzima, presente nos plastídeos, recicla o glutamato e incorpora o esqueleto carbônico no ciclo para transferência de grupamento amino a um  $\alpha$ -ceto-ácido (Figura 2). As plantas possuem inúmeras isoenzimas da GS, que são classificadas de acordo com sua localização subcelular, citossólica (GS1) e plastidial (GS2). Nas folhas, a GS2 funciona para assimilar os íons amônio produzidos pela redução do íon

nitrato e da fotorrespiração (LIMAMI et al., 1999; CAPUTO et al., 2009), normalmente está mais ativa quando a planta está submetida a excesso de luminosidade ou estresse (CREN e HIREL, 1999); e a GS1 é a principal isoforma assimiladora de íons amônio produzido por outros processos metabólicos, incluindo da fixação simbiótica de nitrogênio nos nódulos de leguminosas (MOREY et al., 2002).



Fonte: <http://www.uky.edu/~dhild/biochem/24/lect24.html>

Figura 2. Reações subsequentes da GS e GOGAT originando glutamina e glutamato.

Até o momento se assume que essas isoenzimas não atuam com funções iguais. (LIMAMI et al., 1999). Cerca de 95% da atividade da GS é devida a atividade citoplasmática da parte aérea. Em plantas C3, como trigo, nas raízes é predominante a forma GS2 (CREN e HIREL, 1999).

A atividade da GS depende da fonte de nitrogênio fornecido para a planta. Se íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Este último elevaria os níveis de GS na raiz, mas este aumento não é extenso, pois a atividade da enzima depende da GOGAT e está dependente do fornecimento contínuo de fonte de carbono para continuar a fixação. Portanto, altos níveis de  $\text{NH}_4^+$  são inibidores de sua atividade. A produção de fonte de carbono da fotossíntese deve ser mobilizada da parte aérea (LANCIEN et al., 2000). Já foi demonstrado que os íons amônio migram através do xilema, sendo então utilizados pela fixação na parte aérea (SCHJOERRING et al., 2002).

A GS citosólica nas raízes de leguminosas tem papel reconhecido por responder com aumento de atividade na presença de amônio liberado pelos bacterióides simbióticos e na maioria das plantas a principal atividade GS citossólica é encontrada no floema. Em cereais foi proposto que a absorção de nitrogênio pela raiz é ineficiente, sendo redirecionada para as partes aéreas para aumentar o crescimento da planta (CAPUTO et al., 2009). Em folhas e raízes de milho (não-leguminosa), foi demonstrado correlação de aumento da atividade desta enzima em associação com bactérias endofíticas (MACHADO et al., 1998). A assimilação de íons amônio em cana-de-açúcar aumentou a expressão de genes de GS citossólica vascular durante o desenvolvimento da parte aérea em variedade de cana-de-açúcar que apresentam habilidade de obter nitrogênio a partir da FBN, enquanto que em variedade não responsiva à FBN, a expressão aumentada não foi verificada (NOGUEIRA et al., 2005). Estudos sobre a expressão de genes de GS em cana-de-açúcar com alta capacidade de fixar nitrogênio a partir da FBN sugeriram o envolvimento da GS no mecanismo de assimilação da amônia (PERIN et al., 2007).

Em trigo hexaploide, estudos de análise de sequência de genes, filogenéticos e de mapeamento demonstraram a existência de 10 genes de GS, que foram subdivididos em 4 famílias de transcritos: GS2 [Gs2 (a, b e c)] e GS1 [Gs1(a, b e c), GSr (1 e 2) e GSe (1 e 2)], que apresentam alto grau de homologia ( $\geq 96\%$ ). A presença de GS1 foi confirmada nas células da camada perifascicular e GSr nas células vasculares e GSe não foi detectado. Estudos de expressão de mRNA demonstraram a menor presença destas isoformas nas raízes comparadas às folhas (PAUX et al., 2008; CAPUTO et al., 2009). Gs1 foi o transcrito que respondeu ao estresse da ausência de nitrogênio com aumento de atividade (CAPUTO et al., 2009). O aumento de atividade em resposta ao estresse parece estar de acordo com o verificado para o estresse salino de menor grau (WANG et al., 2007). Este autor relatou que em folhas, quando o estresse é elevado, a atividade GS é reduzida e entra em substituição a enzima Glutamato desidrogenase (NADH-GDH, E.C. 1.4.1.2) para o utilização da amônia e fornecimento de glutamato para síntese de prolina, importante osmoprotetor (WANG et al., 2007).

## **2.6 Micro-organismos Envolvidos na FBN**

As plantas são eucariontes que estão normalmente associados com procariontes diazotróficos. Os micro-organismos estão envolvidos em processos biológicos que aceleram o

crescimento da planta e podem ser chamados de promotoras de crescimento vegetal (JACKSON e TAYLOR, 1996; KUKLINSKY-SOBRAAL et al., 2004). As associações com eucariontes são de dois tipos principais: a endossimbiótica (simbiótica), de bactérias *Rhizobiaceae* com leguminosas, e as interações associativas de bactérias microaeróbicas com gramíneas e não-leguminosas (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998). Na interação associativa as bactérias podem ser encontradas sobre a superfície da raiz, na camada mais interna do córtex (associação epifítica) ou no interior da raiz, colmo e, especialmente nos espaços inter/intracelulares do parênquima, vasos condutores podendo chegar a parte aérea da planta (associação endofítica) (BALDANI e BALDANI, 2005).

O termo endofítico inclui todos os organismos que são capazes de colonizar, em algum momento do seu ciclo de vida, o interior dos tecidos das plantas sem causar aparente dano ao hospedeiro. Ainda podemos dividir os endofíticos em dois grupos: os endofíticos obrigatórios, que estão presentes no espaço inter/intracelular de raízes das plantas e os endofíticos facultativos, que podem também colonizar a rizosfera (BALDANI et al., 1997).

Já foi amplamente demonstrado que bactérias pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* têm pouca sobrevivência no solo, sendo denominadas de endofíticas obrigatórias (BALDANI et al., 1997; BALDANI e BALDANI, 2005). No entanto, foi descrito na literatura que a classificação de acordo com o habitat pode gerar dúvidas ou mesmo erros, e que algumas espécies do gênero *Azospirillum*, por exemplo, possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e são aptas a colonizar todo o interior das mesmas, enquanto outras, apenas colonizam a camada de mucilagem ou células do córtex danificadas das raízes (SALA et al., 2007b). De acordo com os mesmos autores, existem casos de respostas positivas à inoculação de vários gêneros e espécies de bactérias endofíticas, como também ausência de resposta da planta à inoculação ou mesmo de efeitos negativos, dependendo da espécie vegetal, do genótipo, das condições nutricionais, assim como de fatores abióticos do meio ambiente.

## 2.7 *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum*, afiliado filogeneticamente ao *Betaproteobacteria* (ROTHBALLER et al., 2006), foi primeiramente descrito com a espécie *Herbaspirillum seropedicae*, como sendo a primeira espécie endofítica a ser identificada (BALDANI et al., 1986). Após esse evento, outros membros do gênero foram incluídos tais como o *H.*

*rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996), *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001) e o *H. lusitanum* (VALVERDE et al., 2003). Além disso, novas espécies de bactérias diazotróficas endofíticas estão sendo descritas, como *H. hiltneri*, isolado de plantas de trigo (ROTHBALLER et al., 2006).

Dos organismos listados até agora, todos apresentam a capacidade de fixar N atmosférico, mas de acordo com os últimos dados taxonômicos, isso não pode mais ser considerada uma característica comum dentro do gênero *Herbaspirillum*. Existem outras bactérias que foram incluídas no gênero *Herbaspirillum* por causa de seu parentesco filogenético e bioquímico (SCHMID e HARTMANN, 2003), embora a maioria dos isolados, não fixarem N e não serem derivados de origem vegetal (*H. chlorophenolicum*, *H. putei*, *H. autotrophicum* e *H. huttiense*). Destas, apenas a *H. putei*, apesar não fixar N em condições laboratoriais, apresentou o gene *nifH* (ROTHBALLER et al., 2006).

As espécies colonizadoras de raiz do gênero *Herbaspirillum* foram detectadas não apenas na superfície da raiz, mas também intra e intercelularmente (ROTHBALLER et al., 2006). Estas bactérias parecem preferir as plantas da família das gramíneas como hospedeiro, mas também foram encontradas em outras espécies (BALDANI e BALDANI, 2005). Foi observado que o isolamento de estirpes de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* inoculadas em solo, só foi possível na presença da planta hospedeira. Esse fato ocorreu, provavelmente devido à liberação de substâncias promotoras de crescimento na rizosfera, proporcionado pela planta (OLIVARES et al., 1996; BALDANI e BALDANI, 2005).

*H. seropedicae* é uma bactéria diazotrófica, gram-negativa, capaz de estabelecer associações endofíticas (BALDANI et al., 1997), e pôde ser isolada de muitas gramíneas, tais como milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar, de várias plantas forrageiras crescidas no Brasil, assim como também do trigo (BALDANI e BALDANI, 2005).

A fixação do N em trigo inoculado com *H. seropedicae* foi avaliada em vasos usando <sup>15</sup>N. Nestes experimentos foi demonstrada a fixação do N atmosférico nas raízes e nos grãos do trigo e a adição de fertilizantes nitrogenados inibiu completamente a fixação por *H. seropedicae*. A inoculação aumentou o rendimento de raízes e grãos em até 23 e 31%, respectivamente (EL-KOMY et al., 2003).

Entretanto, estudos mais completos da interação trigo e *H. seropedicae* estão sendo realizados, afim de uma maior exploração e entendimento desta associação endofítica, uma vez que há a influência do genótipo das plantas (independente de espécie) na associação planta/bactéria (BALDANI e BALDANI, 2005).

Na Tabela 1 estão representados estudos referentes a interação, não apenas de *H. seropedicae*, mas de várias espécies desse mesmo gênero, com espécies não-leguminosas, ligados à FBN.

Tabela 1. Estudos realizados visando à exploração da interação entre as espécies do gênero *Herbaspirillum* e plantas não-leguminosas.

ESPÉCIE	GRAMÍNEA	LOCAL	REFERÊNCIA
<i>Herbaspirillum</i> spp. <i>H. seropedicae</i>	Arroz	Brasil, RJ	(RADWAN et al., 2004) (BALDANI et al., 2000) (GUIMARÃES et al., 2010)
		Brasil, PR	(BRUSAMARARELLO, 2007)
		Índia	(GOVINDARAJAN et al., 2008)
		Japão	(ELBELTAGY et al., 2001)
<i>Herbaspirillum</i> spp.	Aveia	Brasil, RS	(SOARES et al., 2006)
<i>Herbaspirillum</i> spp.	Cana-de-açúcar	Brasil, RJ	(REIS JUNIOR et al., 2000)
		Índia	(MUTHUKUMARASAMY et al., 2006) (OLIVEIRA et al., 2002)
<i>H. rubrisubalbicans</i> e <i>H. seropedicae</i>		Brasil, RJ	(OLIVEIRA et al., 2006) (OLIVEIRA et al., 2009)
<i>H. frisingense</i>	<i>Miscanthus</i> e cevada		(ROTHBALLER et al., 2008)
<i>Herbaspirillum</i> spp.	Milho	Brasil, RJ	(MACHADO et al., 1998) (RADWAN et al., 2004)
<i>H. seropedicae</i>		Brasil, PR	(BALSANELLI et al., 2010)
		Uruguai	(MONTAÑEZ et al., 2009)
<i>Herbaspirillum</i> spp.	Sorgo	Brasil, RJ	(JAMES et al., 1997)
<i>H. seropedicae</i>	Trigo	Egito	(EL-KOMY et al., 2003)
		Brasil, SP	(SALA et al., 2005)

## 2.8 Características Genéticas dos Diazotróficos

Na década de 1980, um novo padrão de identificação bacteriana começou a ser desenvolvido. Foi demonstrado que as relações filogenéticas de bactérias, e, de fato, todas as formas de vida, pode ser determinada comparando uma parte estável do código genético. Atualmente, a parte do DNA mais comumente utilizadas para fins taxonômicos de bactérias é o gene 16S rRNA. Este gene pode ser comparado não somente entre todas as bactérias, mas também com o gene 16S rRNA de archeobacteria e do gene 18S rRNA de eucariotos (CLARRIDGE, 2004).

A filogenia de bactérias diazotróficas com base no gene *nifH* é semelhante à filogenia baseada em gene 16S rRNA, por isso, o gene *nifH* tem sido amplamente utilizado para estudar a filogenia e diversidade de bacterias diazotróficas (SARITA et al., 2008).

A FBN é um processo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados de genes *nif*, os quais codificam para proteínas envolvidas diretamente neste processo. O estudo da genética de *Klebsiella pneumoniae* levou a descoberta de 20 genes envolvidos na FBN. Desses 20 genes *nif* descobertos, cerca de 14 deles, foram encontrados na maioria das bactérias diazotróficas (GONZÁLES, 2008).

O gene *nifH* codifica para unidade estrutural da dinitrogenase redutase (MoFe-proteína) e os genes *nifD* e *nifK* codificam para as subunidades estruturais da dinitrogenase (Fe-proteína), que juntas, ambas dinitrogenases, formam o complexo da nitrogenase. Estes genes, principalmente o *nifH*, têm sido utilizados como marcador no estudo das bactérias fixadoras de N, além de ser usado para a caracterização da diversidade filogenética dessas bactérias (SARITA et al., 2008).

### 2.8.1 *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

A espécie *H. seropedicae* possui várias estirpes e atualmente foi seqüenciado o genoma da estirpe SmR1, um mutante espontâneo resistente a estreptomicina da estirpe Z78. Seu genoma é constituído por um único cromossomo circular de 5.513.887 pb e um total de 4.735 ORFs potenciais, codificando 3.108 proteínas com funções conhecidas, 497 proteínas preditas e 1.130 sem função conhecida. Foram também identificadas seqüências que codificam para 55 tRNAs representando todos os 20 aminoácidos. A estirpe SmR1 é capaz de crescer na presença monossacarídeos tais como D-glicose, D-frutose, D-galactose, D-Larabinose, com açúcar-álcool e ácidos orgânicos tais como L-malato e L-lactato. No entanto, não é capaz de crescer em oligo ou polissacarídeos. Apresenta capacidade limitada de crescer em aminoácidos como fonte de carbono, sendo capaz de utilizar L-prolina, L-tirosina, D/L-alanina,  $\beta$ -alanina, L-isoleucina e L-glutamato (PEDROSA et al., 2011).

E, de acordo com os mesmos autores, os genes *nif* foram encontrados em uma região abrangendo 37.547 pb intercalados com os genes *fix*, *mod*, *hes*, *fdx*, *hsc* entre outros. Os 46 ORFs deste ‘cluster’ estão organizados em 7 genes *nifA*, operons dependentes de  $\sigma^{54}$ . O ‘cluster’ *nif* carrega todos os genes necessários para a síntese e atividade da nitrogenase, inclusive para a absorção de molibdênio, transporte de elétrons, síntese do ‘cluster’ de metal, e o gene regulador do operon *nif*, portanto, um ‘cluster’ capaz de dotar um organismo com a plena capacidade de fixar nitrogênio.

Quanto ao metabolismo de ureia, é capaz de sintetizar e degradar ureia. Possui genes que codificam para as enzimas do ciclo completo da ureia, que é a provável via para a biossíntese de arginina, utilizando prolina e carbamoil-fosfato como precursores. A ureia seria degradada pela urease (PEDROSA et al., 2011).

## 2.9 Modo de Colonização por Bactérias Endofíticas

As bactérias endofíticas são encontradas geralmente, em maior número nas raízes, decrescendo progressivamente do caule às folhas (OLIVARES et al., 1996; ROESCH et al., 2006), o que demonstra que as raízes são a principal “porta de entrada” dessas bactérias, as quais conseguem penetrar pelos locais que foram danificados naturalmente devido ao próprio crescimento da planta, ou ainda, nas junções das raízes primárias com as secundárias ou nos pêlos radiculares. Nas últimas duas situações, a bactéria produz enzimas capazes de degradar as paredes celulares da planta hospedeira, como celulasas e pectinases (SALA et al., 2007b), isto porque, a lamela média que conecta as células vegetais entre si, é uma camada delgada rica em pectina e as paredes primárias (fina e flexível, presentes em células jovens) e secundárias (mais espessa e rígida encontrada em células maduras) contêm aproximadamente 30% e 70% de celulose, respectivamente (TAIZ e ZEIGER, 2009). Para ocorrer a colonização intracelular, a parede celular primária e/ou secundária tem de ser degradada. Padrões similares de invasão também têm sido descritos para *Acetobacter diazotrophicus*, bem como para bactérias endofíticas não-diazotróficas em plantas dicotiledôneas (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998).

A penetração das bactérias próximo as raízes laterais também tem sido observado por *Azospirillum* spp., sugerindo que as bactérias não relacionados taxonomicamente, podem compartilhar mecanismos semelhantes de interação com ambas as plantas, monocotiledôneas e dicotiledôneas (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998).

No entanto, nem todas as bactérias que possuem a capacidade de penetrar na planta hospederira, produzem enzimas que degradam parede celular vegetal. Pedrosa et al. (2011), não encontraram no genoma de *H. Seropedicae* SmR1, genes que codificam enzimas responsáveis pela degradação da parede celular da planta, tais como glicosidases, celulasas e hemi-celulasas, enzimas associados à penetração de bactérias. É provável, portanto, que este organismo dependa apenas de descontinuidades naturais da epiderme da raiz da planta para a penetração (OLIVARES et al., 1997; SALA et al., 2007b).

O ápice da raiz é considerado uma das regiões de colonização primária, principalmente na zona de alongamento e diferenciação celular, onde as bactérias podem invadir inter e intracelularmente, penetrando nos tecidos mais centrais antes da diferenciação dos vasos condutores e da endoderme, que mais tarde irá constituir um limite, ou seja, uma barreira física, pois possui em suas paredes, incrustações de suberina e lignina, que formam a chamada estria de Caspary (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998; SALA et al., 2007b). Foi observado que, após três dias de inoculação com *H. frisingense*, haviam células bacterianas inseridas no cortex da raiz e após 7 dias, já colonizavam o tecido vascular, região mais central da raiz (ROTHBALLER et al., 2008).

Em *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a presença de certas enzimas que degradam a parede celular, tais como as endocluconases, endoxiloglucanases e endopolimethylgalacturonases, levanta a especulação de que estas enzimas podem ajudá-las a competir com outros micro-organismos presentes na rizosfera e colonizar os tecidos internos dos sistemas da planta com sucesso (SARAVANAN et al., 2007). *Azoarcus* sp. BH72 expressa a enzima celulolítica endoglucanase que cliva ligações  $\beta$ -1,4-glicosídica de fibras de celulose, e como estas bactérias não usam essas enzimas para metabolizar celulose e celobiose, o seu papel pode ser o de auxiliar na invasão da planta (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998).

## **2.10 Interação Planta-Bactéria**

Muitos autores relatam que o genótipo da planta é um fator chave para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas endofíticas (LOREDO-OSTI et al., 2004; BALDANI e BALDANI, 2005; SALA et al., 2005; WICHERN et al., 2008). Isto acontece porque no interior da planta estão protegidas de outros micro-organismos, além de terem maior acesso aos nutrientes disponibilizados pelas plantas (BALDANI e BALDANI, 2005; SALA et al., 2007b). Porém, este grupo de micro-organismos é influenciado por fatores bióticos (o genótipo da planta e da comunidade microbiana do solo) e abióticos (a disponibilidade de nitrogênio) (ROESCH et al., 2006).

Quando a bactéria diazotrófica é introduzida no campo, por inoculação, a multiplicação e o estabelecimento na rizosfera são fatores importantes para obtenção dos benefícios propiciados por estas na associação com plantas não-leguminosas, uma vez que precisam competir com outros micro-organismos já existentes no solo (BALDANI et al., 1986).

Primeiramente, as bactérias quando ainda não associadas com a planta hospedeira, são selecionadas pelos substratos liberados pela planta, ou seja, pelos produtos da rizodeposição, tais como exsudatos, lisados e ácidos orgânicos, utilizados como fonte de energia (SALA et al., 2007b). Esses substratos variam de espécie para espécie, pois as células do cortex vegetal responsáveis por sua produção/liberação são geneticamente influenciadas (WICHERN et al., 2008), e como os produtos da rizodeposição estão envolvidos no processo de quimiotaxia das bactérias em direção às raízes, conseqüentemente leva a seleção das mesmas. Um exemplo são as lectinas excretadas pelas raízes das plantas de trigo, que atuam como sinais moleculares para associação com *Azospirillum*, sendo elas fundamentais para determinar a especificidade genotípica entre planta-bactéria (ANTONYUK e EVSEEVA, 2006).

Essa característica dos produtos da rizodeposição promove a proliferação das bactérias e é essencial para o estabelecimento da bactéria na rizosfera. Depois de instaladas no interior da planta, as bactérias são ainda mais dependentes das fontes de carbono disponibilizadas pela planta (SALA et al., 2007b).

## **2.11 Contribuição das Bactérias Diazotróficas no Desenvolvimento Vegetal**

É também relevante o potencial para promoção do crescimento que é observado por outros fatores, além da FBN. As bactérias diazotróficas são também conhecidas como Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV). A maioria dos endofíticos é capaz de produzir fitormônios, tais como ácido 3-indol-acético (AIA), ácido abscísico, etileno, zeatina e outras auxinas/citocininas produzidas por bactérias como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (ZAKHAROVA et al., 1999; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; LEE et al., 2004). Os fitohormônios alterariam a morfologia das raízes, aumentando o número, o comprimento, o desenvolvimento de um maior número de raízes laterais e a capacidade de absorver nutrientes (SALA et al., 2005; SPAEPEN et al., 2008). Além destes fitohormônios, também são produzidas substâncias ‘seqüestradoras’ de ferro, solubilizantes de fosfatos entre outros (BHATTACHARJEE et al., 2008).

A bactéria em associação com a planta pode influenciar no balanço hormonal vegetal. O etileno é um importante exemplo que mostra como esse balanço hormonal afeta o crescimento vegetal. Nos vegetais, o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) é precursora do etileno e este é o fitohormônio responsável por promover o aumento na estatura das

plantas, no peso de raízes e biomassa em presença do N em plantas de milho (SHAHAROONA et al., 2006). Baixos níveis de etileno podem promover o crescimento de partes apicais do vegetal e crescimento e alongamento das raízes (GLICK, 1995), mas em concentrações altas o etileno inibe o crescimento e é conhecido como o fitohormônio da senescência (PIERIK et al., 2006).

A presença da ACC deaminase nas bactérias e de auxinas estão positivamente correlacionadas com o crescimento da planta hospedeira, pelo controle dos níveis de etileno produzidos no estresse. Certas bactérias são capazes de reduzir os níveis de etileno pela degradação do ACC, através da produção da 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACCd) bacteriana, que reduziria os níveis endógenos de etileno na planta (KHALID et al., 2004).

Na literatura foi apresentado um mecanismo molecular para explicar essa relação entre as BPCV e as plantas. Neste mecanismo, o AIA sintetizado pela bactéria aderida a raiz é assimilado pela planta e juntamente com o AIA produzido endogenamente pela planta, estimulariam a divisão e o alargamento celular assim como promoveriam a síntese do ACC (precursor do etileno) dentro da planta, a partir da ativação da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato síntase (ACCs) sob condições de estresse. O ACC é convertido em etileno pela ação da 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACCo). Uma porção significativa do ACC poderia ser exsudado pelas raízes e a bactéria a hidrolizaria (pela ação ACCd) em  $\alpha$ -cetobutirato e amônio (ARSHAD e FRANKENBERGER JR, 1998; GLICK, 2005; PEDROSA et al., 2011). Uma consequência direta dos níveis mais baixos do ACC dentro da planta (tanto endógeno como AIA induzido) seria a redução do etileno dentro da planta a tal ponto de provocar uma inibição na alongação da raiz, aumentando a formação dos pêlos radiculares e deste modo modificando a morfologia radicular (ARSHAD e FRANKENBERGER JR, 1998). A modulação dos níveis de etileno nas plantas diminuiria a resposta ao estresse promovido pelo etileno, permitindo assim o crescimento das plantas sob condições de estresse.

Este mecanismo provavelmente pode ser visto na interação entre planta e *H.seropedicae* SmR1, uma vez que, foi verificada a presença do gene ACCd no genoma dessa bactéria, além desta possuir 4 vias para a síntese de AIA (PEDROSA et al., 2011).

As alterações anatômicas estimuladas pela presença de fitohormônios também podem vir acompanhadas por um aumento na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase da fração microsomal das células radiculares e conteúdo protéico (BALDANI e BALDANI, 2005), alterando o potencial de

membrana da raiz permitindo deste modo, maior ou menor fluxo de nutrientes (BASHAN e LEVANONY, 1991).

Outro efeito benéfico, consequência do aumento radicular e da superfície de absorção, é o aumento na capacidade de absorver nutrientes e água. As BPCV também favoreceriam a solubilização de fosfatos pela produção de ácidos que atuam sobre o P insolúvel (PEDRAZA, 2008) e liberando o fosfato de compostos orgânicos tais como os fitatos (UNNO et al., 2005); pela oxidação do sulfato (BANERJEE e YESMIN, 2002) e pela formação de sideróforos que são compostos de baixo peso molecular secretados pelas raízes das plantas e as bactérias, que atuam capturando o Ferro na rizosfera (KATIYAR e GOEL, 2004; LOREDO-OSTI et al., 2004).

A rizosfera é um ambiente altamente competitivo para a sobrevivência, desenvolvimento da bactéria e a capacidade de adquirir  $Fe^{3+}$  complexados a sideróforos de solos com limitação de ferro. A *H. seropedicae* SmR1, apresenta no seu genoma cerca de 27 genes envolvidos no transporte e metabolismo do ferro. Esta bactéria possui um gene muito grande (27.483 pb) que codifica um peptídeo modular sintase que, provavelmente é a única proteína na síntese de sideróforos. Apresenta também, vários receptores de sideróforos, tornando-a altamente competitiva em solos com limitação de ferro (PEDROSA et al., 2011).

O efeito de aumento na produtividade e conteúdo de proteínas em grãos também foi observado na cultura do trigo inoculada com *Azospirillum* sp (DÍAZ-ZORITA e FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2008). Autores citam que plantas de trigo afetadas por déficit hídrico durante o florescimento apresentaram maior tolerância à seca pelo aumento da zona radicular e um ajustamento elástico proporcionando maior produtividade e qualidade dos grãos (CREUS et al., 2004). Por outro lado, propõem-se que a tolerância à seca aconteceria devido a um aumento no conteúdo de prolina e compostos fenólicos devido a colonização bacteriana e esta proporcionaria uma maior adaptação ao estresse hídrico (BARKA et al., 2006). E, os exsudatos liberados pelas raízes serviriam como fonte de carbono para as bactérias diazotróficas após o plantio, estimulando o seu crescimento levando a um aumento da população microbiana (OLIVARES et al., 1996).

As bactérias diazotróficas poderiam também ativar um mecanismo a inibição do crescimento de organismos antagônicos (UTKHEDE et al., 1999; DOBBELAERE et al., 2003) e na interação com outros micro-organismos do solo (BASHAN et al., 1996). O antagonismo microbiano poderia ocorrer pela inibição do crescimento bacteriano pela difusão de antibióticos e compostos orgânicos voláteis, toxinas ou biosurfactantes; pela competição

por sítios de colonização e nutrientes; pela competição por minerais (P e sideróforos); pela degradação dos fatores de parasitismos do patógeno tais como toxinas; e pelo parasitismo que podem envolver a produção de enzimas que degradam a parede celular como as quitinases e a  $\beta$ -1,3 glucanases (WHIPPS, 2001; WHEATLEY, 2002; COMPANT et al., 2005; HAAS e DEFAGO, 2005; RAAIJMAKERS et al., 2006; BERG, 2009). Poderiam ainda ativar um mecanismo de indução de resistência sistêmica à patógenos denominado de Indução Sistêmica da Resistência (ISR) (VAN LOON, 2007; BERG, 2009).

Algumas bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum* spp. apresentam também a capacidade de degradar poluentes ambientais como benzeno, tolueno, etanol e xileno (MOORE et al., 2006; ROESCH et al., 2008).

## **2.12 A Fertilização Nitrogenada na FBN**

A maioria dos solos no mundo são deficientes em N e aplicações de fertilizantes nitrogenados são essenciais para o bom rendimento de culturas de cereais. Geralmente, a ureia é a mais conveniente fonte de N. Mas, infelizmente, menos de 50% da ureia é usada pelas plantas (KENNEDY et al., 2004). Além de problemas ambientais, sistemas de preparo de solo, fazendo uso à longo prazo de ureia pode esgotar teores de matéria orgânica (WAIRIU e LAL, 2003).

Por esse motivo, há uma grande preocupação para obtenção de fontes alternativas de nitrogênio, tais como o uso da tecnologia da FBN, que pode complementar ou substituir fertilizante químico. Além disso, uma utilização eficaz de resíduos orgânicos pode diminuir o empobrecimento do solo orgânico (JEYABAL e KUPPUSWAMY, 2001), fornecendo uma solução alternativa para o problema, sustentando o N orgânico como um amortecedor para os fluxos de N inorgânico no sistema solo-planta (KENNEDY et al., 2004).

E, na literatura foi sugerida uma estreita relação entre níveis de adubação nitrogenada e a frequência de isolamento de *G. Diazotrophicus*, em cana-de-açúcar. Quando a cana foi adubada com mais de 200 kg N / ha, as frequências de isolamento foram de 0-2%. Em níveis inferiores à 120 kg / ha de N, o aumento da frequência foi de até 70%. No entanto, este impacto negativo sobre as bactérias não foi visto como um efeito direto da adubação nitrogenada mas sim, a associação com o endófito foi afetada quando o estado fisiológico da planta era alterado pelo nitrogênio (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993). Esse efeito, também é relatado nos estudos de Roesch et al. (2006), em que caracterizou bactérias diazotróficas

associadas a dois genótipos de milho e avaliou o efeito da adubação nitrogenada sobre estes microorganismos.

Outros autores também estudaram os efeitos de altos níveis de adubação nitrogenada (300 kg / ha de N) na ocorrência e nos números de *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar no Brasil. Relataram que os altos níveis de N afetaram a população microbiana, dependendo do genótipo em que foram inoculadas bactérias. Houve a diminuição do número de *G. diazotrophicus* no genótipo de cana SP79-2312. No entanto, nada aconteceu com a população microbiana, quando o mesmo genótipo foi inoculado com *Herbaspirillum* spp. ou quando *G. diazotrophicus*, foi inoculada em outro genótipo na presença de adubação nitrogenada. Tais resultados demonstram que altas taxas de N podem ou não afetar as bactérias e que existe uma alta correlação entre o genótipo da planta e o tipo da bactéria associada a ele (REIS JUNIOR et al., 2000). O efeito negativo da adubação nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar também foi verificado em outros trabalhos (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2006).

Em outro estudo, autores também relatam uma correlação negativa entre a o tamanho da população bacteriana inoculada e os níveis de fertilizante nitrogenado em plantas de trigo inoculadas com *A. brasilense*. Porém verificaram essa diminuição apenas entre o 60º e 90º dia de cultivo. Essa supressão das bactérias no solo da rizosfera de trigo tratados com altos níveis de fertilizantes poderia ser explicada pelo fato de que a sobrevivência de bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre na região da rizosfera estaria associada à presença de exudatos das raízes das plantas e da presença extra de nitrogênio combinado (ALAMRI e MOSTAFA, 2009).

Na literatura foi descrito que o teor de aminoácidos totais contidos no apoplasto das plantas pode inibir a FBN. Foi observado um decréscimo de 6 a 9 vezes no teor de aminoácidos totais contidos no apoplasto de plantas de cana-de-açúcar com ausência de fertilizante nitrogenado comparadas com as adubadas (TEJERA et al., 2006). Vários autores relataram em seus estudos, que a população de *G. diazotrophicus* foi sensível à aplicação de fertilizante nitrogenado (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 2002; TEJERA et al., 2004). Tejera et al. (2006) observaram que o aumento de aminoácidos na planta e a diminuição das populações bacterianas podem estar correlacionados, e conseqüentemente, ter interferido na FBN.

Os resultados das interações planta-diazotróficos, em termos de potencial agrônomo, FBN ou promoção do crescimento vegetal (PCV), depende de muitos fatores bióticos (genótipo da planta e da comunidade microbiana do solo) e abióticos (disponibilidade de nitrogênio). A compreensão da dinâmica desse processo, poderia revelar novos métodos de inoculação microbiana e adubação nitrogenada, que renderiam uma utilização mais eficiente de nitrogênio, aumentando a PCV. Esta informação pode representar uma importante contribuição para a criação de um sistema de gestão adequado para as culturas de cereais, que poderiam melhorar os efeitos da associação natural com as bactérias diazotróficas (ROESCH et al., 2006).

Os mesmos autores relatam que, o avanço no conhecimento sobre a estrutura da comunidade bacteriana fixadora de nitrogênio, naturalmente associada com as plantas, por meio de técnicas microbiológicas e moleculares, seriam informações estratégicas que poderiam ser usados para introduzir com sucesso isolados de bactérias diazotróficas em programas de inoculação.

Mesmo a FBN sendo tão variável (em relação ao micro-organismo, ao genótipo da planta, as condições ambientais e ao estado nutricional do solo) seu estudo continua sendo importante e necessário. Novos experimentos deverão ser realizados para obter respostas quanto às interações entre plantas e diazotróficos, o estabelecimento de bactérias, o processo de colonização, a FBN (incluindo aspectos genéticos), para ser possível promover o crescimento em diferentes espécies de plantas (PEDRAZA, 2008).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultivo *in vitro* das plântulas**

O experimento *in vitro* foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná - *Campus* Palotina. Os genótipos avaliados foram avaliados: CD104, CD105, CD108, CD111, CD117, CD119, CD120 e CD 150 (Tabela 2).

A obtenção de plântulas de trigo foi realizada a partir da extração de embriões maduros de trigo (NEIVERTH et al., 2010) modificado, onde as sementes foram desinfetadas em solução comercial de hipoclorito de sódio diluído a 20% por 10 min, seguidas por 6 lavagens em água destilada e autoclavada. Posteriormente, as sementes foram deixadas imersas em

água destilada e autoclavada por 16 h na geladeira, em seguida imersas em etanol comercial a 75% (v/v) por 5 min. e postas para secar em papel de filtro em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar. Com auxílio de um estereoscópio binocular, os embriões maduros tiveram seus coleóptilos excisados e dispostos com o escutelo para cima em meio de indução. O meio de indução foi o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 30,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, sem reguladores vegetais e pH ajustado para 5,8. Os meios foram solidificados com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup>.

Tabela 2. Características quanto ao ciclo, maturação plena (dias), estatura média (cm), acamamento de todos os genótipos de trigo avaliados *in vitro* e em casa de vegetação.

Genótipo	Ciclo	Média à maturação plena (dias)	Estatura média (cm)	Acamamento
CD 104	Médio	118	80 - Baixa	Moderadamente resistente
CD 105	Precoce	114	82 - Média	Moderadamente resistente
CD 108	Superprecoces	110	70 - Baixa	Resistente
CD 111	Precoces	114	80 - Média	Moderadamente resistente
CD 117	Precoces	116	77 - Baixa	Moderadamente resistente
CD 119	Médio	122	85 - Média	Moderadamente resistente
CD 120	Médio	120	84 - Média	Moderadamente resistente
CD 150	Precoces	115	68 - Baixo	Moderadamente resistente

Fonte: Guia de produtos trigo, COODETEC, 2010.

Em seguida, as plântulas germinadas e enraizadas (aproximadamente 28 dias), foram individualmente colocadas em tubo de ensaio contendo 20 mL de solução MS líquido (com 30,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, sem reguladores vegetais e pH ajustado para 5,8 diluído 10 vezes). Estas foram colocadas em sala de crescimento sob condições de fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro com temperatura de 23 °C ± 2 °C.

### 3.1.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial 8 x 2, onde haviam 8 genótipos em 2 condições (com e sem inoculação) resultando em 16 tratamentos. A unidade experimental foi composta por 10 plântulas e as análises dos parâmetros foram feitas com 3 repetições. Para avaliar as diferenças entre os tratamentos realizou-se a análise de variância, considerando genótipos na presença/ausência de bactérias

como tratamentos, aplicando-se o teste Tukey a 5% para diferenciar as médias por meio do programa estatístico Genes (CRUZ, 2001).

### 3.1.2 Avaliação de contaminação

Depois de 24 h em meio líquido, 10 plântulas foram selecionadas aleatoriamente, e destas, 0,5 mL do meio foi tomado para plaquear em meio BDA (meio de batata) (MOUTIA et al., 2003) e NFbHP (CHAVES et al., 2007), para realização de controle microbiológico. Passadas 24 h, as placas de BDA e NFbHP foram analisadas. Tubos com plântulas que apresentassem turvação e/ou presença de colônias nas placas foram descartados, os demais foram divididos em dois grupos: Inoculados e Não inoculadas.

### 3.1.3 Co-cultivo in vitro de plântulas de trigo e *H. seropedicae* SmR1

Antes de inoculadas com *H. seropedicae* SmR1, todas as plântulas de trigos permaneceram 48 h em meio líquido MS diluído 10 vezes com objetivo de permitir adaptação e recuperação.

Em seguida, 10 plântulas foram inoculadas com  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> da bactéria *H. seropedicae* SmR1 para experimento de co-cultivo (BRUSAMARARELLO, 2007). O inóculo de bactérias foi preparado com descrito no ítem a seguir. Outros dez tubos contendo plântulas foram separados sem adição de bactéria.

Decorridos 7 dias de co-cultivo das plântulas, em sala de cultivo vegetal sob temperatura e luminosidade controladas, as mesmas foram retiradas e tiveram a parte aérea separada das raízes. As raízes foram lavadas com água destilada autoclavada, secas em papel toalha, pesadas e congeladas para análise de conteúdo de amônio e atividade da GS. A parte aérea foi reservada para as análises de massa fresca, seca e NT. Os ensaios foram realizados em triplicadas, isto é, 3 amostras de plântulas inoculadas e 3 amostras de plântulas não inoculadas, sendo cada amostra formada por raízes ou parte aérea de 10 plântulas.

#### 3.1.3.1 Manutenção e cultivo da bactéria *H. seropedicae* SmR1

A bactéria foi mantida por sucessivas passagens em meio sólido NFbHP em placa e mantidas em estufa a 28 °C. Para preparo do inóculo, uma colônia da bactéria foi transferida

para um pré-inóculo. Este, foi preparado com 5 mL de meio líquido DYGS (MOUTIA et al., 2003) em falcon de 50 mL, e mantido a 28 °C em uma incubadora tipo Shaker a 120 rpm. Passadas 24 h, o crescimento foi quantificado por turbidimetria (Espectrofotômetro marca HOMIS modelo SF 200-DM Digital) em 600 nm. Para preparo do inóculo 1,0 ml de pré-inóculo, com aproximadamente 1,0 unidade de densidade ótica (D.O.), foi transferido para erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio DYGS por mais 24 h. O cultivo foi então utilizado para inoculação nas plântulas de trigo quando atingiu a fase exponencial do crescimento e medida a turbidez. A relação 1,0 D.O. para  $4,4 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup> foi utilizada para inocular  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> nos tubos com as plântulas.

#### 3.1.4 Determinação da massa fresca e seca

Para determinar massa seca, a parte aérea depois de pesada, foi colocada em estufa de secagem a 65°C por 72 h. Para determinar a massa fresca de raiz, estas foram lavadas com água destilada e autoclavada, secas com papel toalha, pesadas e por fim envolvidas em papel alumínio e congeladas até o uso.

#### 3.1.5 Determinação de nitrogênio total (NT)

As amostras de peso seco foram destinadas a análise de NT (Kjeldahl) de acordo com o método descrito por (BREMNER e MULVANEY, 1982).

#### 3.1.6 Determinação do conteúdo de amônio

As amostras de raízes foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido. Em seguida, 100 mg da amostra macerada foi destinada ao ensaio de conteúdo de amônio descrito por (BRAUTIGAM et al., 2007), modificado. À amostra foi adicionado 500 µL de HCl 100 mM seguido de 250 µL de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por 15min à 4°C. As fases foram separadas por centrifugação (16.000g, 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 20.000g, por 5 min a 8 °C. Para a quantificação de amônio, o sobrenadante obtido após o tratamento com carvão foi diluído (1:1 v/v) em 100 mM de HCl. Então, 200 µL

dessa solução quantificada pelo método do Indofenol (BERTHELOT, 1859). Como padrão foi usada uma solução de sulfato de amônio  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  e lida em espectrofotômetro a 620nm.

### 3.1.7 Atividade da glutamina sintetase (GS)

Amostras de raízes anteriormente maceradas em  $\text{N}_2$  líquido foram homogeneizadas ainda na presença de  $\text{N}_2$  líquido com o tampão de extração (TRIS-HCL, 50 mM, pH 7,5,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, PMSF 100 mM). Para cada 0,5 g de raiz utilizou-se 1 mL do tampão. O extrato foi transferido para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, o extrato foi agitado por alguns minutos em agitador de tubos vortex, mantendo-os gelados e, então centrifugados a 10.000g por 10 min. Foram separados os restos de tecido vegetal do sobrenadante, e este extrato foi usado para determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972), e o ensaio de atividade da GS, modificado a partir do método proposto (REIS et al., 2009). Os ensaios foram realizados em tubos contendo glutamato 105 mM, hidroxilamina 17,5 mM, ATP 50 mM,  $\text{MgSO}_4$  50 mM, Tris-HCl 50 mM em pH 7,8 e extrato enzimático adicionado para volume final de 2,0 mL. A reação foi iniciada pela adição do extrato ao meio de reação pré-incubado a  $30^\circ \text{C}$ , seguida de agitação dos tubos. Após a incubação de 5 min, foi adicionado 1,0 mL reagente paralisante (0,2M de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,73M de TCA, 0,68M de HCl) para interromper a reação. Em seguida, os tubos foram centrifugados 5.000g por 5 min, à temperatura ambiente, para a remoção das proteínas precipitadas. Os tubos utilizados como branco incluíam o extrato e todos os reagentes do meio de reação, exceto o ATP. As leituras das absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro à 535 nm. A quantidade de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato produzida foi estimada considerando que  $1 \mu\text{mol}$  deste produto, gera uma absorbância de 0,34 (SHAPIRO et al., 1970).

### 3.1.8 Análise microscópica da morfologia de raízes

As raízes dos tratamentos (inoculado e não inoculado) foram lavadas com água destilada e foram submergidas em solução de violeta genciana (1%) por aproximadamente 5 min. Em seguida, as raízes foram cortadas transversalmente, dispostas em lâminas com água destilada e coberta por lamínulas. As imagens foram capturadas em microscópio óptico com 40 vezes de aumento.

### 3.1.9 Contagem microbiana

Passado o tempo de co-cultivo, foram selecionadas aleatoriamente 3 tubos com plantas controle e 3 tubos com plantas inoculadas, para serem submetidas a contagem microbiana (epifítica e endofítica).

#### 3.1.9.1 Contagem epifítica:

Os tubos com as plantas selecionadas foram levados para câmara de fluxo laminar, onde foram separadas a parte aérea das raízes. Em seguida as raízes foram mergulhadas em 3 recipientes contendo água destilada e autoclavada, postas em solução salina e levadas ao sonicador por 1 min. Então, foram aliqüotados 100 µL desta solução salina e feitas 2 diluições (100 µL para cada diluição). Da última diluição da solução salina, foi plaqueado 0,1 mL em meio BDA e 0,1 mL em meio NFbHP.

#### 3.1.9.2 Contagem endofítica:

As raízes da contagem epifítica, foram imersas em solução de HgCl<sub>2</sub> (0,01 g de HgCl<sub>2</sub> em 100 mL de água destilada) por 30 s, posteriormente lavadas com água destilada e autoclavada. Então estas raízes foram maceradas em solução salina, e levadas ao sonicador por 1 min. e foram feitas duas novas diluições e plaqueados 0,1 mL em meio BDA e NFbHP.

### 3.1.10 Análise molecular

#### 3.1.10.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para confirmar a presença da *H. seropedicae* epifítica e endofiticamente foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar a presença do genes 16SrRNA e *nifH*. O DNA genômico bacteriano foi extraído, segundo o protocolo de (CHENG e JIANG, 2006). Para a reação de PCR, os oligonucleotídeos 16SrRNA 1 e 2 (DG74 5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A - 3' e RW1 5'-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3') e *nifH* 1 e 2 (senso 5'-ACC CGC CTG ATC CTG CAC GCC AAG G -3' e antisenso 5'-ACG ATG TAG ATT TCC TGG GCC TTG TT-3') foram utilizados para a amplificação de fragmentos internos dos

genes (310 e 317 bp, respectivamente). Cada reação (20 µL) continha 7 µL Tampão 5X Go Taq Flexi DNA polimerase (PROMEGA); 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25Mm)(PROMEGA), 4 µL dNTPmix (2,5mM)(FERMENTAS); 1µL de Taq polimerase 5U (PROMEGA); 1µL de DNA e 1µL dos oligonucleotídeos específicos para os genes 16SrRNA (100 Mm) e *nifH* (100 mM). As reações foram submetidas aos seguintes programas: 16SrRNA - 5 min. a 94 °C, seguido de 35 ciclos de amplificação (30 s a 94 °C; 30 s a 54 °C; 1 min. a 72 °C) e extensão final de 5 min. a 72 °C; *nifH* - 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de amplificação (45 s a 94 °C; 45 s a 54 °C; 45 s a 72 °C) e extensão final de 1 min. a 72 °C, em termociclador Biocycler modelo MJ96+. Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em tampão TAE 1X em gel de agarose 1,5% (p/v) e utilizando marcador de 100pb, visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em fotodocumentador Loccus Biotecnologia L.PIX.

### 3.2 Cultivo em casa de vegetação

O experimento em casa de vegetação foi realizado na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola Ltda (COODETEC) em Cascavel – PR. Foram avaliados no experimento em casa de vegetação, cinco genótipos de trigo: CD104, CD108, CD119, CD120 e CD 150 provenientes do programa de melhoramento da COODETEC (Tabela 2).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema fatorial 5 x 4 (5 genótipos em 4 condições, resultando em 20 tratamentos com 5 repetições). Plantas de cada genótipo foram submetidas aos seguintes condições avaliadas: 1 – Testemunha; 2 – Adição de N na forma de ureia, 142 Kg ha<sup>-1</sup>, (N); 3 – Adição de inóculo contendo *H. seropedicae* SmR1 (10<sup>6</sup> células por semente) (Hs) e 4 – Adição de ureia + inóculo contendo *H. seropedicae* SmR1 (10<sup>6</sup> células por semente) (N+Hs). Os dados obtidos foram submetidos a análise da variância seguida da comparação das médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, a partir do programa Genes (CRUZ, 2001).

Os vasos foram dispostos de forma aleatória na casa de vegetação, de modo a terem as mesmas condições de radiação solar e temperatura (25°C ±2 e umidade relativo ar de 60%). Foram semeadas 5 sementes por vaso e após 15 dias da germinação foi realizado o desbaste, deixando-se apenas 4 plantas por vaso.

Os vasos plásticos continham aproximadamente 4,5 Kg de solo previamente peneirado, mas sem adubação química. O solo utilizado para o experimento continha as seguintes características químicas: pH = 6,60; P = 951,10 mg dm<sup>-3</sup>; K = 1,44 cmol dm; Ca = 12,25 cmol

dm; Mg = 1,76 cmol dm; H+Al = 2,03 cmol dm; Cu = 2,90 mg dm<sup>-3</sup>; Mn = 178,00 mg dm<sup>-3</sup>; Fe = 140,00 mg dm<sup>-3</sup>; Zn = 26,00 mg dm<sup>-3</sup>; SB = 15,15 cmol dm<sup>-3</sup>.

Para o preparo do inoculante, as bactérias ensaiadas foram repicadas em meio DYGS líquido. As culturas cresceram a 28 °C sob agitação constante a 120rpm por 24 h. O plantio foi realizado manualmente, utilizando 5 sementes por vasos. Seguido da germinação das sementes, foi feita a seleção das plantas e deixadas 4 plantas por vaso. A aplicação de ureia foi feita 30 dias após a germinação das sementes.

As avaliações foram divididas em duas etapas. Para a primeira etapa de avaliações, foi feita uma coleta no estádio de emborrachamento /início da emergência da espiga, onde foram coletadas 1 planta por vaso, que foram submetidas as mesmas avaliações propostas para os ensaios *in vitro* (massa fresca, conteúdo de amônio e glutamina sintetase em raízes; massa fresca, seca e conteúdo de nitrogênio total na parte aérea).

Por ocasião da colheita, foi feita a segunda etapa de avaliações, correspondente a produtividade, a partir das 3 plantas que restaram por vaso. Foram avaliados os seguintes parâmetros: a massa da planta inteira, produção por planta (massa de sementes em gramas) e massa de 100 sementes.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Avaliação *In vitro***

Em ensaios preliminares o tempo de co-cultivo foi determinado. Nestes, foram avaliados parâmetros bioquímicos, químicos e fisiológicos nos tempos de 7, 15 e 21 dias. O período de 7 dias apresentou as melhores respostas e portanto, foi o tempo adotado no co-cultivo nos experimentos *in vitro*.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos para a massa fresca de raízes e massa fresca e seca da parte aérea. Somente o genótipo CD104 apresentou diferença significativa entre a massa de raízes das plântulas não inoculadas (3,00 g) comparada com as inoculadas (1,74 g). Os demais apresentaram valores considerados iguais ao nível de 5% de significância. Avaliando este parâmetro entre os genótipos, verificou-se que as plântulas não inoculadas do CD 108 apresentaram maiores valores para a massa fresca de raiz (3,05 g) se comparadas às massas das plântulas do genótipo CD 111 (1,26 g). Entre as plântulas inoculadas, o genótipo CD 119, apesar de não diferir estatisticamente dos genótipos CD 108,

CD 117, CD 120 e CD 150, apresentou a melhor resposta em termos de massa de raiz e o CD 111, apesar de não diferir dos genótipos CD 104, CD 105 e CD 108, apresentou a menor massa.

Tabela 3. Massa fresca de raiz, massa fresca de parte aérea e massa seca de parte aérea em função da inoculação com *Herbaspirillum seropediace* e ausência de inóculo. UFPR, Palotina – PR, 2011.

Genótipo	Não inoculado	Inoculado	Não inoculado	Inoculado	Não inoculado	Inoculado
	Massa fresca de raiz (g)		Massa fresca da parte aérea (g)		Massa seca da parte aérea (g)	
CD 104	3,00 Aab	1,74 Bbc	7,52 Aa	5,09 Bcd	0,82 Aa	0,65 Bb
CD 105	1,71 Aab	1,66 Abc	5,11 Aa	3,99 Bd	0,51 Ab	0,48 Ac
CD 108	3,05 Aa	2,08 Aabc	6,24 Aa	4,97 Acd	0,58 Aab	0,72 Ab
CD 111	1,26 Ab	1,14 Ac	4,90 Aa	3,57 Ad	0,65 Aab	0,45 Bc
CD 117	2,56 Aab	2,58 Aab	5,99 Aa	5,01 Acd	0,69 Aab	0,68 Ab
CD 119	2,47 Aab	2,79 Aa	6,67 Aa	7,73 Aa	0,72 Bab	0,89 Aa
CD 120	2,06 Aab	2,17 Aab	5,73 Aa	6,01 Abc	0,61 Aab	0,67 Ab
CD 150	2,40 Aab	2,37 Aab	5,16 Ba	6,82 Aab	0,56 Bab	0,73 Aab
C.V. %	23,14		15,97		12,9	

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

Os resultados da massa fresca da parte aérea (Tabela 3) apresentaram diferenças significativas entre plantas sem inoculação e com inoculação para os genótipos CD 104, CD105 e CD 150. Plântulas não inoculadas do CD 104 apresentaram uma massa 1,47 vezes maior comparadas às inoculadas, demonstrando que o co-cultivo teve efeito negativo no crescimento destas plântulas no tempo avaliado. As plântulas inoculadas com *H. seropedicae* da cultivar CD 150 apresentaram valores de massa fresca maiores que as não inoculadas. Entre os genótipos, o comportamento foi igual para todas as plântulas sem inoculação. Porém quando inoculadas, a cultivar CD 119 apresentou o melhor comportamento assim como na variável de massa fresca de raízes.

Os dados de massa seca da parte aérea demonstram que as plântulas não inoculadas dos genótipos CD 104 e CD 111 apresentaram diferenças estatisticamente superiores ao inoculado. Porém, nos genótipos CD 119 e CD 150 o co-cultivo com *H. seropedicae* promoveu um aumento de massa seca da parte aérea comparado com as plântulas sem inoculação. Os demais genótipos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3). O comportamento de massa seca de parte aérea entre os genótipos foi semelhante ao comportamento de massa fresca, isto é, destacando o comportamento do CD

150 frente ao co-cultivo com a bactéria. O co-cultivo apresentou um efeito negativo no crescimento para, principalmente as plântulas da cultivar CD 104, nestas três variáveis avaliadas.

Na literatura, diversos trabalhos avaliando o potencial da FBN em gramíneas já foram realizados, porém os resultados são controversos. Já foi observado o efeito positivo sobre o aumento da massa fresca e seca em arroz inoculado com *H. seropedicae* (BALDANI et al., 2000), entretanto, não foi observado incremento na massa seca de plantas de trigo inoculadas com *G. diazotrophicus* (YOUSSEF et al., 2004) e com *H. seropedicae* (SALA et al., 2005).

Os resultados obtidos para massa seca e fresca de parte aérea e massa fresca de raízes *in vitro* não permitem concluir um comportamento superior de um dos genótipos quanto ao co-cultivo com *H. seropedicae* SmR1. Este aspecto poderia ser explicado pelo fato da eficiência, em relação à FBN de estirpes de *H. seropedicae* em gramíneas dependerem de uma especificidade planta-bactéria, necessitando de melhoramento genético das estirpes e genótipos vegetais disponíveis (SALOMONE e DÖBEREINER, 1996; SCHOLTER e HARTMANN, 1998; BALDANI et al., 2000). Outros autores ainda recomendam que mais de uma estirpe presente na interação planta-bactéria poderiam reverter em resultados eficientes (OLIVEIRA et al., 2006). Entretanto, os resultados para a massa seca e fresca da parte aérea, apontam a cultivar CD 150, como capaz de se beneficiar da associação.

O nitrogênio total (NT) medido na parte aérea das plântulas e conteúdo de íons amônio nas raízes está apresentado na Tabela 4. O NT avaliado após 7 dias de co-cultivo, não apresentou diferenças significativas entre as plântulas não inoculadas e as inoculadas. Entre os genótipos verificam-se diferenças estatísticas significativas. Os genótipos CD 104 e CD 105 apresentaram os melhores valores para o NT tanto nas plântulas não inoculadas como nas inoculadas. Tais resultados corroboram para demonstrar uma habilidade inerente ao próprio genótipo de reverter maiores teores de N em massa seca e fresca da parte aérea (Tabela 3). Porém o CD 117, nas plântulas inoculadas, apesar de não diferir estatisticamente dos genótipos CD 108, CD 119, CD120 e CD150, se destacou por apresentar os menores níveis de NT comparado às cultivares CD 104 e CD 105.

Comparando estes dados com outros experimentos *in vitro* percebemos uma ineficiência na associação com *H. seropedicae* x trigo assim como para outras bactérias diazotróficas. A bactéria *A. brasilense* Sp245 não foi capaz de aumentar o conteúdo de NT em plantas de trigo após a inoculação (SPAEPEN et al., 2008). Sala *et al* (2005) avaliando a reinoculação de 7 estirpes de bactérias isoladas de *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em dois

cultivares de trigo, não observaram aumento do NT, exceto para um isolado sobre um dos cultivares de trigo. Os dados obtidos confirmam o proposto por (BALDANI et al., 2000) onde a especificidade na associação entre bactérias-planta é necessária para o melhor desempenho da planta.

Tabela 4. Nitrogênio total na parte aérea e conteúdo de íons amônio em raízes das plântulas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* e não inoculadas. UFPR, Palotina – PR, 2011.

Genótipo	Não inoculado	Inoculado	Não inoculado	Inoculado
	Nitrogênio total [(g /g de parte aérea).10 <sup>-3</sup> ]		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [(µmoles /mg de raiz).10 <sup>-4</sup> ]	
CD 104	96 Aa	86 Aa	55 Babc	292 Aa
CD 105	96 Aa	84 Aa	59 Aabc	78 Abc
CD 108	47 Ab	46 Abc	71 Aab	142 Abc
CD 111	52 Ab	55 Ab	86 Aa	128 Abc
CD 117	46 Ab	34 Ac	67 Babc	159 Ab
CD 119	42 Ab	45 Abc	14 Bc	28 Ac
CD 120	42 Ab	43 Abc	11 Bc	30 Abc
CD 150	40 Ab	41 Abc	22 Abc	58 Abc
C.V. %	13,08		43,3	

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

Na presença do inóculo os valores de massa fresca e seca da parte aérea, foram menores que nos controles, possivelmente explicado pelo estado de senescência precoce que pode ter sido induzida pela presença das bactérias (Figura 3).

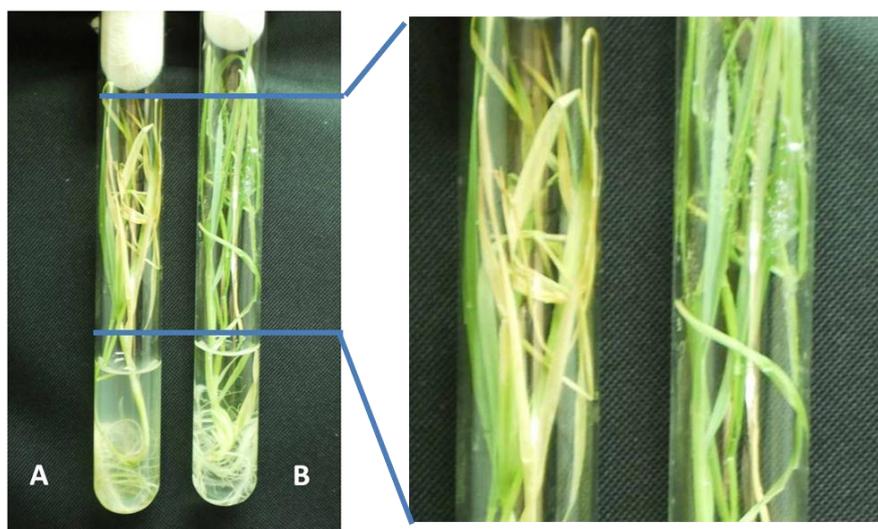


Figura 3. Amostragem da senescência na parte aérea das plântulas de trigo após 7 dias em meio líquido em co-cultivo com *Herbaspirillum seropedicae* (A) e não inoculadas (B) onde permaneceram no meio líquido por igual período de tempos.

Os dados obtidos para o conteúdo de amônio nas raízes (Tabela 4), revelaram diferenças significativas para os genótipos CD 104, CD 117, CD 119 e CD 120, onde podemos estimar um aumento de 5,3, 2,3, 2,0 e 2,7 vezes respectivamente, do conteúdo de amônio nas raízes das plântulas inoculadas em relação às não inoculadas. Os demais genótipos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. É possível observar também comportamentos distintos entre os genótipos para este parâmetro. Dentre os genótipos, quando não inoculados, o CD 111, apesar de não diferir dos genótipos CD 104, CD 105, CD 108 e CD 117, apresentou o maior conteúdo de íons amônio, enquanto que, os genótipos CD 119, CD120 e CD 150 apresentaram os menores. Entre os genótipos de plântulas inoculadas com *H. seropedicae*, o que apresentou maior conteúdo de íons amônio foi o CD 104 e, o CD 119 foi o que apresentou o menor conteúdo de amônio nas raízes quando comparado ao CD 104. O íon amônio em elevadas concentrações é tóxico para as plantas superiores. O alto teor deste íon pode ocorrer devido a fotorrespiração em situação de estresse ou alta luminosidade. A associação planta-bactéria ou o cultivo *in vitro* poderiam caracterizar esta situação de estresse, levando a senescência que por sua vez acarretaria no aumento de íons amônio.

Uma maior assimilação de amônio poderia levar a um desenvolvimento vegetal mais acelerado, levando então as plantas a uma senescência precoce (VINCENT et al., 1997). Altas concentrações de amônio na planta, também poderiam causar a toxicidade das plantas e as plantas evitariam a toxicidade assimilando o amônio na forma de aminoácidos. Os altos conteúdos de amônio poderiam ter sido causados pela degradação dos aminoácidos. Este estresse associado à inoculação poderia levar a aumento da fotorrespiração o que eleva os níveis de amônio e portanto à senescência (TAIZ e ZEIGER, 2009). Yuossef et al (2004), observaram que na colonização de raízes por *Gluconacetobacter*, houve uma migração destas bactérias no sentido do fluxo transpiratório de plantas de trigo. Tais bactérias, se presentes em grandes concentrações poderiam causar o entupimento do xilema e floema provocando a senescência precoce das mesmas.

A atividade da GS ensaiada nas raízes inoculadas e não inoculadas (Figura 4) não apresentaram diferenças significativas, exceto no CD 104, onde a maior atividade foi observada nas raízes das plântulas sem inoculação. Entre os genótipos não houve diferença significativa, exceto o CD 150 que se destacou na atividade enzimática dentre os inoculados.

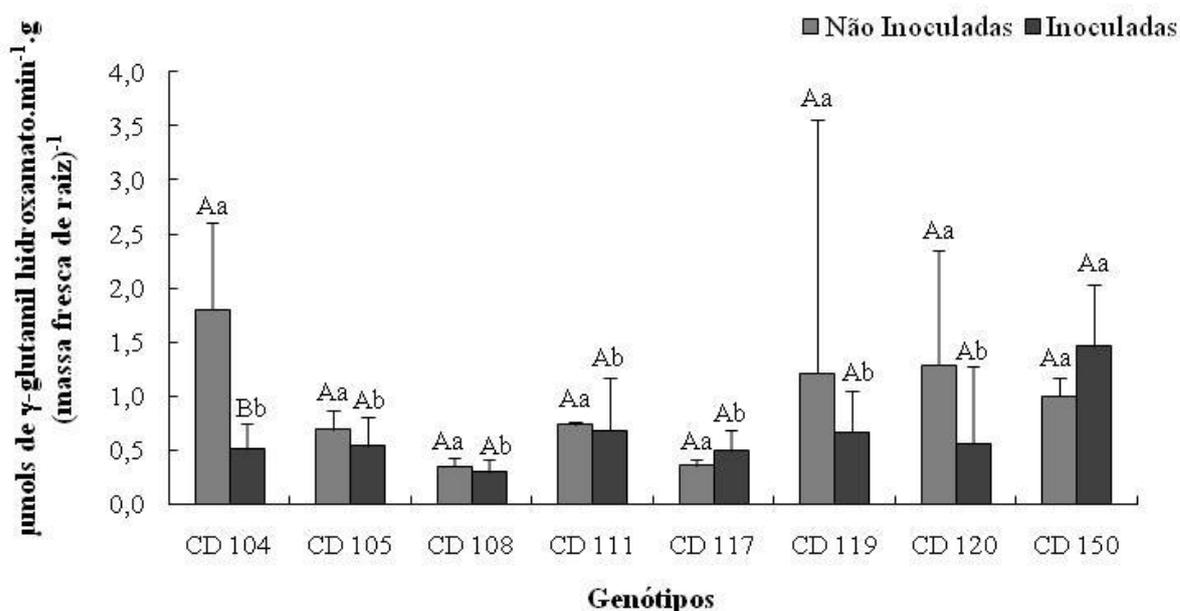


Figura 4. Atividade da glutamina sintetase em raiz de plântulas de trigo não inoculadas e inoculadas com *H. seropedicae* *in vitro*. Colunas seguidas da mesma letra maiúscula, entre tratamentos no mesmo genótipo, e minúscula, entre genótipos no mesmo tratamento, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Estes resultados podem ser explicados pelo fato da GS ser uma enzima cuja atividade sofre regulação coordenada por inúmeros fatores em plantas superiores. Provavelmente, fatores de regulação sejam dependentes do genótipo e não foram afetados pela associação propriamente dita. Em trigo está descrito que a função da GS citosólica é principalmente a assimilação de amônia em glutamina para transporte e distribuição, e esta por sua vez, está dependente da sua localização. Estudos usando imunolocalização mostraram a presença da enzima em folhas, caules e ráquis de plantas e especialmente nas células perifasciculares da bainha. Na literatura estão relatados que a expressão e padrão de proteínas mostraram que as subfamílias da GS do trigo são diferencialmente expressas nas folhas, pendúculo, gluma e raízes sugerindo que a assimilação dos íons amônio deva ocorrer possivelmente nas partes aéreas (BERNARD et al., 2008).

Apesar de demonstrado o aumento da atividade da GS em plantas transgênicas nos nódulos para absorção de amônia oriunda da FBN com *Rhizobium*, em *Lotus Japonicus* L., foi demonstrado que o comportamento da atividade de GS em raízes foi negativamente correlacionado com a produção de biomassa. Nestes experimentos foi demonstrado que a atividade da GS de raízes de plântulas crescidas em meio contendo íons nitrato contribuem

apenas com aproximadamente 14% de variação na produção de biomassa (LIMAMI et al., 1999).

Embora com a menor contribuição da GS1, a GS2 dos plastídeos das raízes é quem forma o nitrogênio amida que é consumido localmente, e esta GS altera o seu nível de expressão em função dos níveis de carboidratos e da luminosidade. A GS2 está associada com a NADH-GOGAT plastidial das raízes reconhecida em utilizar o íon amônio absorvido da rizosfera (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Baseados nestes dados da literatura, podemos sugerir que nos experimentos avaliando o co-cultivo da *H. seropedicae* x trigo, a atividade da GS das raízes não contribuiu com a fixação de amônio, possivelmente produzido pela FBN na raiz. O íon amônio pode ter sido deslocado para a parte aérea, contribuindo com a senescência precoce observada nas plântulas após os 7 dias de co-cultivo. Este fato está em acordo com (LIMAMI et al., 1999; CAPUTO et al., 2009), que relataram que amônio é transportado pelo xilema (SCHJOERRING et al., 2002) e que é utilizado pela GS1 vascular das partes aéreas.

O cultivo em meio líquido das plântulas é um sistema abiótico, portanto estressante para as plântulas. Em plântulas de trigo foi verificado que em condições de estresse (NaCl 100mM) a atividade da GS aumenta; entretanto quando este estresse é acentuado (NaCl 300mM) a atividade da GS diminui e o uso do nitrogênio passa a ser através da atividade da Glutamato desidrogenase NAD dependente (NADH-GDH) (WANG et al., 2007). O CD 104 foi a cultivar que apresentou maior atividade da GS entre todas as cultivares nas raízes das plântulas sem inoculação e no tratamento inoculado do próprio genótipo. Esta cultivar, pelos dados de GS obtidos, possivelmente demonstra estar sob severa depressão da atividade enzimática pela condição de estresse das plântulas inoculadas. Todos os demais genótipos apresentaram valores similares de atividade da GS entre plântulas não inoculadas e inoculadas, o que supostamente pode indicar que as demais foram mais sensíveis à condição abiótica submetida que o CD 104.

Este comportamento está também refletido nos dados de íons amônio quantificados nas raízes das plântulas (Tabela 4). A diminuição da atividade na ordem de 4 vezes nas plântulas não inoculadas está acompanhado do aumento no conteúdo de íons amônio de aproximadamente 5 vezes. O genótipo CD 117 apresentou o maior conteúdo de íon amônio nas plântulas inoculadas que nas não inoculadas, mas não apresentou diferenças na atividade da GS. As diferenças de conteúdo de íons amônio nos CDs 119 e 120 refletem o mesmo comportamento na atividade da GS apesar destas, não diferirem estatisticamente.

Entre genótipos inoculados, a atividade GS do CD150 se mostrou superior aos demais (Figura 4). Este dado pode estar relacionado a um menor efeito de inibição da GS, visto que também não foi observado o aumento significativo de amônio (Tabela 4).

As análises microscópicas da morfologia de raízes dos genótipos revelam diferenças interessantes quanto à presença de pêlos radiculares. As raízes das plântulas inoculadas especialmente dos genótipos CD 105, CD 117, CD 119 e CD120 apresentaram visualmente aumento proeminentemente e perceptível nos pêlos radiculares que foram especialmente maiores em extensão comparados às raízes das plântulas que não foram inoculadas (Figura 5).

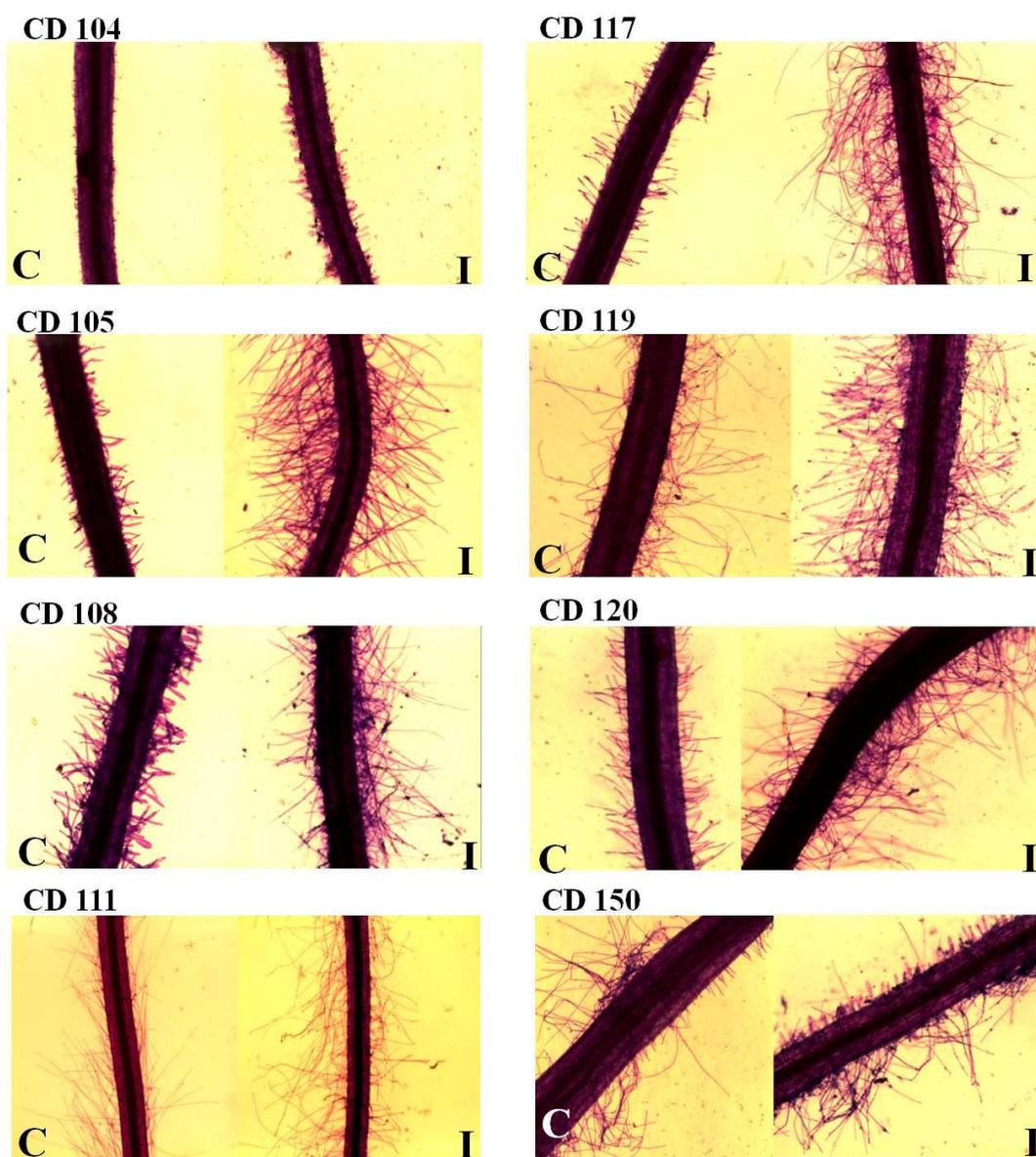


Figura 5. Imagem microscópica das raízes de plântulas inoculadas e não inoculadas, de todos os genótipos em aumento de 40 vezes. (C) Plântula não inoculada e (I) Plântula inoculada.

Um dos efeitos mais bem documentados sobre o modo de ação da associação planta-bactéria é aumento da área radicular nas plantas inoculadas (MARIANO et al., 2004; COCKING, 2005; BENEDUZI et al., 2008; LONG et al., 2010). A maioria dos BPCV é capaz de produzir fitormônios, tais como ácido indolacético, ácido abscísico, etileno, zeatina e outras auxinas/citocininas que alterariam a morfologia das raízes, aumentando o número, o comprimento, o desenvolvimento de um maior número de raízes laterais e a capacidade de absorver nutrientes.

Os resultados concordam com os obtidos por Spaepen et al. (2008), que estudando o efeito da associação de trigo com *A. brasiliense* observaram um incremento na formação de pêlos radiculares e diminuição no comprimento das raízes. Este aumento da zona pilífera poderia ser explicado pelo fato da associação planta-bactéria induzir à formação de auxinas, especialmente o AIA, permitindo o aumento da formação de pêlos em detrimento do alongamento das raízes, aumentando deste modo a área de absorção de nutrientes. Outros autores observaram que plantas de trigo ITD-19 reinoculadas com bactérias diazotróficas apresentaram comprimento de raízes significativamente maiores que a testemunha (SALA et al., 2005).

Como já descrito, a bactéria em associação com a planta pode influenciar no balanço hormonal vegetal, pois são capazes de reduzir os níveis de etileno pela degradação do ACC, precursor do etileno nas plantas, através da produção da ACCd bacteriana que reduz os níveis endógenos de etileno na planta (GLICK, 2005; PEDROSA et al., 2011). Esta redução do etileno dentro da planta provocaria uma inibição do alongamento da raiz, aumentando a formação dos pêlos radiculares e deste modo modificando a morfologia radicular (ARSHAD e FRANKENBERGER JR, 1998).

O efeito que produz aumento de pêlos radiculares é atribuído à produção de AIA (SPAEPEN et al., 2008). A produção de AIA pelo *H. seropedicae* é bem descrita na literatura (BASTIÁN et al., 1998). Os efeitos dos fitohormônios explicariam o aumento acentuado de pêlos radiculares em alguns genótipos (CD 105, CD 117, CD 119 e CD120) quando inoculados com *H. seropedicae*. Neste experimento também foi observado que as plântulas inoculadas apresentaram menor comprimento de raízes comparadas com as não inoculadas (dados não mostrados), que poderia ser proveniente da redução do etileno ocasionado pela atividade da ACCd produzida pela bactéria. Os genes que codificam esta enzima está presente no genoma da *H. seropedicae* SmR1 (PEDROSA et al., 2011). Entretanto a diminuição dos níveis de etileno na planta são controlados pelo efeito de ativação da ACC oxidase pelo AIA.

Com os níveis controlados de produção de etileno pela planta, a bactéria controlaria a resposta ao estresse provocado pelo próprio etileno. Entretanto se esse controle não for executado corretamente, podem ser observados efeitos de diminuição demasiada do etileno ou sua super produção.

Nestes experimentos, vários fatores podem ser responsabilizados pela senescência precoce observada nas plântulas inoculadas. Entretanto, nenhum destes possíveis fatores pode ser comprovado pelos experimentos executados. A primeira hipótese seria a elevada concentração de etileno, fitohormônio da senescência, no final do experimento (após os 7 dias do co-cultivo) apesar do menor comprimento total das raízes nas plântulas inoculadas. Ou ainda a produção de outros fitohormônios que induzem a senescência tais como: ácido jasmônico, ácido salicílico, ácido abscísico. Na associação *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar, foi mostrada a expressão de genes da biossíntese de ácido jasmônico (VARGAS et al., 2003) assim como também a expressão aumentada de proteínas do operon que produz isoleucina, co-fator do ácido jasmônico (SANTOS et al., 2010).

Outra possível explicação seria o co-cultivo ser mais limitante para o desenvolvimento da plântula do que na ausência da bactéria, pois ocorreria uma competição pelos nutrientes entre plantas e bactérias. Essa situação de estresse poderia ser percebida causando a senescência, que levaria ao consumo de suas próprias fontes de carbono, especialmente proteínas, aumentando os níveis de  $\text{NH}_4^+$ . Este é reconhecido pela sua atuação como fator importante de toxicidade, que para algumas espécies é percebido pela diminuição da razão raiz/parte aérea e raiz delgada/raiz grossa (BRITTO e KRONZUCKER, 2002).

Para a verificação da presença epifítica e/ou endofítica das bactérias *H. seropedicae* nas raízes das plântulas inoculadas dos diferentes genótipos de trigo, foi realizada a contagem microbiana e testes moleculares. Nos resultados obtidos, foi observada a presença de *H. seropedicae* epifiticamente nas raízes de trigo em todos os genótipos avaliados, porém, foi ausente o crescimento de bactérias endofiticamente nos genótipos CD 104, CD 119 e CD 150 (Tabela 5). Nas plântulas não inoculadas, não houve crescimento microbiano de qualquer tipo, provando a inocuidade dos experimentos. Os resultados da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no meio BDA apresentaram os mesmos resultados que no meio NFbHP, apenas apresentando um maior número de colônias.

Tabela 5. Unidade formadoras de colônia (UFC) *Herbasprillum seropediace* em plantas inoculadas após 7 dias de co-cultivo *in vitro*. UFPR, Palotina – PR, 2011.

Genótipo	Unidades Formadoras de Colônias em meio NFbHP			
	Raiz fresca total da planta		(g) de raiz fresca	
	Epifítico	Endofítico	Epifítico	Endofítico
CD 104	∞	0	∞	0
CD 105	8,60.10 <sup>5</sup>	1,97.10 <sup>5</sup>	5,16.10 <sup>6</sup>	1,8.10 <sup>6</sup>
CD 108	4,39.10 <sup>5</sup>	6,00.10 <sup>5</sup>	2,10.10 <sup>6</sup>	2,88.10 <sup>6</sup>
CD 111	6,10.10 <sup>5</sup>	1,60.10 <sup>4</sup>	5,32.10 <sup>6</sup>	1,39.10 <sup>5</sup>
CD 117	2,41.10 <sup>6</sup>	2,33	9,33.10 <sup>6</sup>	9,03
CD 119	1,09.10 <sup>6</sup>	0	3,88.10 <sup>6</sup>	0
CD 120	2,67.10 <sup>2</sup>	6,45.10 <sup>1</sup>	1,23.10 <sup>3</sup>	2,97.10 <sup>2</sup>
CD 150	5,96.10 <sup>5</sup>	0	2,51.10 <sup>6</sup>	0

Na literatura, alguns autores afirmam que a invasão da bactéria na planta se dá pelas fendas/rompimentos naturais que surgem pela emissão de pêlos (OLIVARES et al., 1996; ROESCH et al., 2006). Correlacionando os dados de emissão de pêlos radiculares nos genótipos CD 105, CD 117, CD 119 e CD 120 com a presença de bactérias endofíticas apenas nos genótipos CD 105, CD 108, CD 111, CD 117 e CD 120, pode-se sugerir que os genótipos CD 105, CD 117 e CD 120 seriam os mais promissores para a associação benéfica planta-bactéria, tanto para a FBN quanto por fatores de promoção de crescimento vegetal (LOREDO-OSTI et al., 2004; SALA et al., 2005).

Em 25 genótipos de arroz inoculados com bactérias diazotróficas foi observado uma variação da população de 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> por grama de raiz, que foi relacionado com os diferentes genótipos estudados (BARRAQUIO et al., 1997). Em cultivares de trigo (IAC24, IAC355 e ITD 19), inoculados com *Azospirillum* spp e *Herbaspirillum* spp foi verificado uma variação de 10<sup>3</sup> a 10<sup>8</sup> bactérias endofíticas por grama de raiz (SALA et al., 2005). Comparados aos resultados obtidos nos 8 genótipos avaliados (Tabela 5) observa-se uma ordem de grandeza semelhante para as cultivares CD 105, CD 108, CD 111 e CD 120. Porém o CD117 apresentou um número inferior de bactérias endofíticas e nos demais não foi constatada a presença destas.

Fontes de carbono são usadas pelas bactérias para sua proliferação e atividades endossimbióticas. Olivares et al. (1996) afirmam que os exsudatos das raízes poderiam prover fonte primária de carbono para as bactérias diazotróficas e desse modo estimular seu aumento populacional. E, foi observado que a associação com bactérias do gênero *G. diazotrophicus* é

bastante restrita e associada a plantas ricas em açúcar (cana-de-açúcar, batata doce e capim camerom) (DÖBEREINER et al., 1995).

A resposta preferencial de alguns genótipos em relação à população microbiana poderia ser explicada pelas variações intrínsecas de cada planta na quantidade e qualidade dos exsudatos radiculares que variam, por sua vez, entre espécies e entre genótipos da mesma espécie (RENGEL, 1997).

As bactérias endofíticas e epifíticas obtidas após co-cultivo foram comprovadas quanto sua origem pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O DNA genômico das colônias (epifíticas e endofíticas) crescidas em meio NFbHP foram analisadas para a presença do 16SrRNA e *nifH*. Oito colônias de bactérias epifíticas e 5 colônias de bactérias endofíticas escolhidas aleatoriamente foram avaliadas e mostraram dois fragmentos de 310bp para o gene 16S rRNA e 317pb para o gene *nifH*, respectivamente (Figura 6). Como esperado, as bactérias presentes no inóculo apresentaram o mesmo padrão de bandas e o branco teve reação de PCR negativa. Como resultados desta análise, todas as bactérias foram caracterizadas como sendo *H. seropedicae*, provenientes do inóculo aplicado.

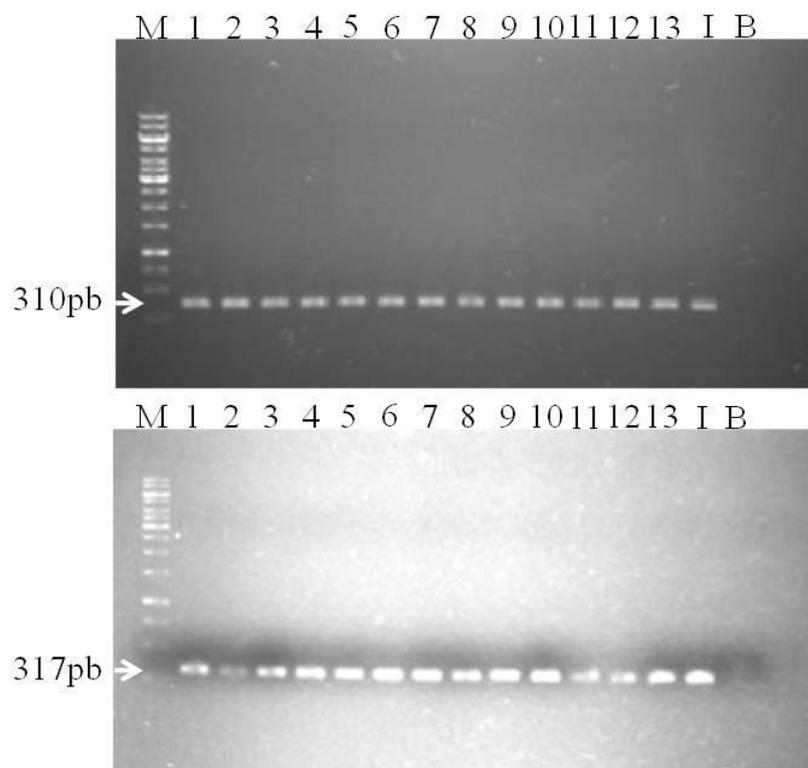


Figura 6. Análises de PCR das bactérias *H. seropedicae* epifíticas e endofíticas isoladas de raízes de trigo após 7 dias de co-cultivo. Linha M-Marcador de peso molecular (Ladder 100pb); Linhas de 1 a 8 – bactérias epifíticas aleatoriamente escolhidas de placas de cultivo provenientes dos genótipos avaliados. Linhas de 9 a 13 – bactérias endofíticas. Linha I – inóculo “controle positivo”. B - Branco.

## 4.2 Cultivo em casa de vegetação

Nas avaliações realizadas aos 65 dias após a germinação, na fase de emborrachamento/início da emergência da espiga, foi verificada a interação significativa tanto entre tratamentos por genótipo, como entre genótipos por tratamentos para as variáveis avaliadas.

Observou-se que para a massa fresca de raiz na avaliação tratamento x genótipo, as cultivares CD 108, CD119, CD120 e CD150 não apresentaram diferenças estatísticas. Entretanto, no genótipo CD 104 a aplicação de nitrogênio diminuiu a massa de raízes comparada aos demais tratamentos, inclusive aquele onde a mesma quantidade de uréia foi adicionada nos vasos e as sementes foram inoculadas com *H. seropedicae* (N+Hs) (Tabela 6). Entre os genótipos, verificou-se que as testemunhas (T) do CD 104 e CD 150 tiveram as melhores médias comparadas ao CD 119, embora sendo similares aos CD 108 e CD 120.

Na presença de nitrogênio (N), os genótipos mais responsivos foram o CD 150 e o CD 108 e, o CD 119, CD 104 e CD 120 apresentaram as menores massas fresca de raízes, que está de acordo com o vigor genético da cultivar, que não se apresentaram alto nas condições experimentais. Quando em associação à *H. seropedicae* (Hs), os genótipos não se diferenciaram entre si, mas quando a bactéria esteve associada ao nitrogênio (N + Hs), os genótipos CD 104 e CD 150 foram os que obtiveram maiores massas fresca de raízes. Este dado remete à presença da bactéria oriunda da inoculação para contrapor o efeito negativo observado para este genótipo quando adubado com ureia (N). As cultivares CD 120 e CD 119 foram as que demonstraram menor desempenho, embora não sejam distintos estatisticamente do CD 108 (Tabela 6).

Para a variável massa fresca da parte aérea, comparando-se o efeito dos tratamentos nos genótipos, a cultivar CD 119 apresentou maior massa da parte aérea em resposta à ureia aplicada correspondendo a um aumento de 42% em relação à testemunha. O genótipo CD 108 apresentou um efeito sinérgico da ureia associada a *H. seropedicae* promovendo um incremento na massa fresca de folhas de 38% em relação à testemunha, sendo superior ao tratamento com apenas ureia (Tabela 6). Entre genótipos, na testemunha, a cultivar CD 104 obteve uma resposta significativamente superior a CD 120. Quando em associação de N + Hs, os genótipos CD 104, CD 108 e CD 119, apresentaram valores similares para massa fresca da parte aérea. Porém em relação aos tratamentos o CD 108 foi o que passou a ter efeito

significativo da associação de N+Hs. Entretanto, quando o tratamento foi à aplicação de ureia (N), os genótipos que se destacaram foram o CD 119, CD 104 e CD150.

Tabela 6. Massa fresca de raiz, massa fresca da parte aérea e massa seca de parte aérea de cinco genótipos em função da testemunha, aplicação de nitrogênio (142 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura) (N), inoculação com *H. seropedicae* SmR1 (Hs) e com *H. seropedicae* SmR1 + nitrogênio (N+Hs). COODETEC, Cascavel – PR, 2011.

Genótipo	Testemunha	N	Hs	N+Hs
	<b>Massa fresca de raiz (g)</b>			
<b>CD 104</b>	1,73 Aa	1,18 Bbc	1,70 Aa	1,64 Aa
<b>CD 108</b>	1,23 Aab	1,54 Aab	1,18 Aa	1,19 Abc
<b>CD 119</b>	0,85 Ab	0,99 Ac	1,17 Aa	1,09 Ac
<b>CD 120</b>	1,39 Aab	1,04 Abc	1,36 Aa	0,90 Ac
<b>CD 150</b>	1,61 Aa	1,88 Aa	1,72 Aa	1,44 Aab
<b>C.V. (%)</b>	28,69			
<b>Massa fresca da parte aérea (g)</b>				
<b>CD 104</b>	14,99 Aa	11,83 Aabc	14,74 Aa	14,48 Aa
<b>CD 108</b>	9,76 Bab	9,19 Bbc	10,90 ABab	13,54 Aa
<b>CD 119</b>	10,94 Bab	15,61 Aa	11,79 Bab	13,50 ABa
<b>CD 120</b>	8,08 Ab	7,59 Ac	9,16 Ab	8,94 Ab
<b>CD 150</b>	11,28 Aab	12,69 Aab	9,25 Ab	10,06 Ab
<b>C.V. (%)</b>	20,09			
<b>Massa seca da parte aérea (g)</b>				
<b>CD 104</b>	3,00 Aab	2,69 Aab	2,87 Aab	3,37 Aa
<b>CD 108</b>	2,11 ABab	1,83 Bb	2,17 ABb	2,85 Aabc
<b>CD 119</b>	3,20 ABa	4,13 Aa	3,18 Ba	4,00 ABab
<b>CD 120</b>	1,88 Ab	3,54 Aab	2,84 Aab	2,33 Abc
<b>CD 150</b>	2,35 Aab	2,26 Aab	2,00 Ab	2,28 Ac
<b>C.V. (%)</b>	25,72			

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

No desdobramento das fontes de nitrogênio para cada cultivar, referente à produção de massa seca da parte aérea, a cultivar CD 108, apresentou o melhor resultado para a associação (N+ Hs), promovendo um aumento de 55% com relação ao tratamento com ureia (N). Para o CD 119, a presença da bactéria (Hs) foi o que proporcionou a pior resposta (Tabela 6). Entre genótipos, as cultivares CD 119 e CD 108 foram estatisticamente distintas quando houve aplicação de nitrogênio (N), demonstrando uma capacidade inerente do genótipo em responder ao N para formação de massa aérea e, na associação (N+Hs), o CD 104 e CD 150 apresentaram desempenhos estatisticamente diferentes com a melhor resposta para o CD 104.

Em outros estudos, foram observados aumentos significativos na biomassa de raízes (57%) e da parte aérea (45%) quando a *Pseudomonas fluorescens* foi inoculada em trigo sem fertilização prévia do solo em casa de vegetação e concluíram que o aumento do crescimento da raiz em resposta à inoculação mostrou ser mais eficiente em condição de menor concentração de nutrientes do solo comparado à solos bem nutridos (SHAHAROONA et al., 2008). Os dados obtidos apontam a uma provável menor eficiência da associação *H. seropedicae* em função da qualidade nutricional do solo usado neste experimento.

Em relação ao conteúdo de amônio quantificados nas raízes frescas, verificou-se que entre tratamentos, o genótipo CD 104 teve um acréscimo de cerca de 109% quando aplicada ureia (N) comparado aos demais. Na cultivar CD 119, o tratamento com aplicação de ureia foi similar estatisticamente aos tratamentos com a bactéria (Hs) e associado (N+Hs), mas superiores à testemunha. Porém no CD 120, os tratamentos que se destacaram, por terem apresentando níveis maiores que a testemunha, foram os da inoculação de *H. seropedicae* (Hs) e (N + Hs), indicando um possível efeito do inoculante biológico sobre os níveis dos íons amônio na raiz (Tabela 7).

Entre os genótipos avaliados nos diferentes tratamentos, observou-se que o genótipo CD 104 apresentou os maiores teores de amônio, entretanto, no tratamento com a presença apenas da bactéria (Hs), os valores foram similares às cultivares CD 120 e CD 119. Ainda no mesmo tratamento, o CD 108 e CD 150 obtiveram os menores níveis de amônio dosado (Tabela 7).

Comparando os resultados de amônio com os obtidos por Lemos (2011), verifica-se que os genótipos (CD 104, CD 108, CD 119, CD 120 e CD 150) apresentaram conteúdos distintos em relação aos tratamentos aplicados. O genótipo CD 120 (associado a *H. seropedicae*, mas sem adubação nitrogenada) foi exceção apresentando o maior conteúdo de amônio associado tanto a *A. brasilense* como a *H. seropedicae*. Nestes experimentos, deve-se ressaltar que as raízes de cada genótipo foram tomadas em plena fase de crescimento (estádio de emborrachamento /início da emergência da espiga), onde não se espera qualquer tipo de senescência da parte aérea que justifique degradação protéica e aumento de íons amônio em razão (CAPUTO et al., 2009). Estes íons amônio nas raízes podem ser advindos da absorção radicular e/ou FBN. Está descrito na literatura que estes íons devem ser convertidos para a forma orgânica ou transportados para a parte aérea com a mesma finalidade (SCHJOERRING et al., 2002). Apenas no genótipo CD 120 se observa este aumento em função da associação com a bactéria, em detrimento da presença da ureia. Este dado pode estar indicando uma

possível FBN, especialmente se considerarmos que o CD 120, no experimento *in vitro*, apresentou presença endofítica da bactéria.

Tabela 7. Conteúdo de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrogênio total de cinco genótipos de trigo em função da testemunha, aplicação de nitrogênio ( $142 \text{ kg ha}^{-1}$  em cobertura) (N), inoculação com *H. seropedicae* SmR1 (Hs) e com *H. seropedicae* SmR1 + nitrogênio (N+Hs). COODETEC, Cascavel – PR, 2011.

Cultivar	Testemunha	N	Hs	N+Hs
	$\text{NH}_4^+$ [( $\mu\text{moles/mg de raiz}$ ). $10^{-4}$ ]			
<b>CD 104</b>	18,37 Ba	38,42 Aa	18,14 Ba	21,66 Ba
<b>CD 108</b>	9,09 Ab	6,41 Ac	8,47 Ab	9,36 Ac
<b>CD 119</b>	8,58 Bb	14,49 Ab	11,60 ABab	17,22 Aabc
<b>CD 120</b>	11,04 Bb	17,54 ABb	20,56 Aa	20,89 Aab
<b>CD 150</b>	8,36 Ab	10,22 Abc	7,79 Ab	12,30 Abc
<b>C.V. (%)</b>	20,86			
Nitrogênio total (mg /g de massa seca)				
<b>CD 104</b>	0,2784 Aa	0,2736 Aa	0,2836 Aa	0,2504 Aa
<b>CD 108</b>	0,2344 Aa	0,2070 Aa	0,2008 Ab	0,2266 Aa
<b>CD 119</b>	0,2162 Aa	0,2404 Aa	0,1566 Ab	0,2144 Aa
<b>CD 120</b>	0,2186 Aa	0,2112 Aa	0,2074 Ab	0,2426 Aa
<b>CD 150</b>	0,2146 Aa	0,2398 Aa	0,1826 Ab	0,2060 Aa
<b>C.V. (%)</b>	29,93			

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

Quando a variável analisada foi o conteúdo de nitrogênio total (NT) determinado na parte aérea para cada genótipo, observou-se que em nenhuma cultivar obteve diferenças estatísticas entre os tratamentos. Em relação ao desempenho entre cultivares, apenas na presença da bactéria (Hs) houve diferenças significativas, onde o genótipo CD 104 apresentou teores de NT maiores que os demais genótipos avaliados (Tabela 7). Em outro trabalho, avaliando os mesmos genótipos, foi verificado que as cultivares CD 108 e CD 150 apresentaram diferenças no conteúdo de NT e o tratamento da associação entre *A. brasilense* e ureia apresentaram as melhores respostas, seguido do tratamento com apenas a inoculação da bactéria (LEMOS, 2011).

Por outro lado, Spaepen et al (2008) relataram que nenhuma estirpe de *Azospirillum* (Sp245 e a mutante FAJ0009) foi capaz de aumentar o conteúdo de NT em plantas de trigo cv Rubino após a inoculação. Sala et al (2005) avaliando o efeito da associação em trigo com diferentes estirpes de *H. seropedicae*, relataram que apenas um dos isolados apresentou maior

concentração de NT. Baldani et al (2000) também relatam a especificidade entre bactérias e plantas para o melhor performance em termos de FBN. Os dados obtidos neste experimento podem estar apontando uma baixa capacidade dos genótipos em converter o íon amônio em nitrogênio total na parte aérea em função de diferenças nas condições experimentais comparado aos experimentos de Lemos (2011), no que diz respeito a uma condição natural de maior fertilidade do solo usado.

Em relação à atividade da GS ensaiada nas raízes, a única cultivar que apresentou atividade enzimática diferenciada entre os tratamentos foi a CD 150, com uma atividade cerca de 3x maior nas plantas adubadas com ureia em cobertura comparada às plantas testemunha e 2x maior no tratamento com as plantas inoculadas com a bactéria (Hs). Tal dado demonstra que o nitrogênio aplicado foi determinante para a atividade desta enzima (Figura 7). Os demais genótipos não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Entre genótipos, no tratamento com aplicação de nitrogênio (N), a cultivar CD 150 apresentou uma atividade de GS 170% maior em relação às cultivares CD 108 e CD 120. Nos demais tratamentos, as cultivares foram similares apresentando o mesmo desempenho.

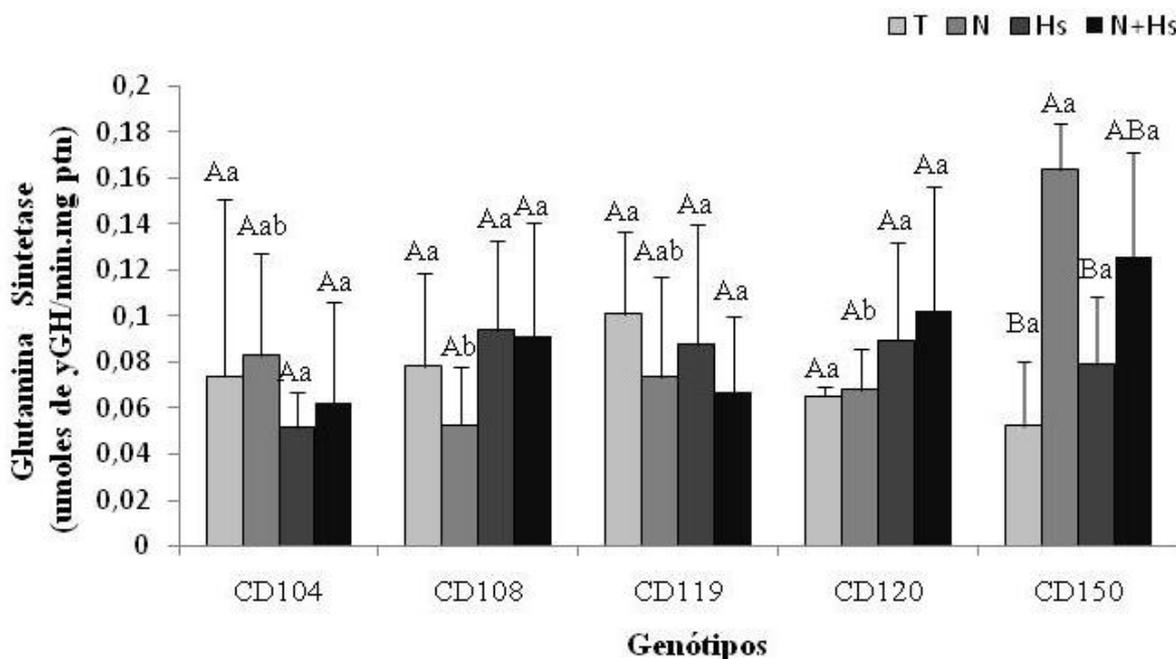


Figura 7. Atividade da glutamina sintetase em raiz de plantas de cinco genótipos de trigo em função da testemunha, aplicação de nitrogênio (142 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura) (N), inoculação com *H. seropedicae* SmR1 (Hs) e com *H. seropedicae* SmR1 + nitrogênio (N+Hs). Colunas seguidas da mesma letra maiúscula, entre tratamentos no mesmo genótipo, e minúscula, entre genótipos no mesmo tratamento, não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

No CD 120, o maior conteúdo de íons amônio nos tratamentos (Hs) e (N+Hs), não influenciou o conteúdo de NT da parte aérea significativamente, nem tampouco a atividade da GS na fase de crescimento avaliada. A falta de correspondência do conteúdo NT pode estar relacionada à fotossíntese neste estágio de crescimento, que é mais alta que nos estágios consecutivos (REYNOLDS et al., 2000), pois a fixação do nitrogênio depende de fonte de carbono que não foi suficiente para fixar na planta (LANCIEN et al., 2000). A fixação dos íons amônio poder ter sido desviada para GS na parte aérea (não quantificada nestes experimentos).

Em relação à massa da planta inteira ao final do ciclo fenológico, os tratamentos apresentaram comportamento similar, à exceção do genótipo CD 119, que em presença do nitrogênio (N) promoveu um incremento de 13% da massa vegetal em relação à testemunha (T) (Tabela 8). Entre genótipos avaliados, a cultivar CD 119 apresentou os maiores valores, na presença de nitrogênio (58%) e na associação de nitrogênio com *H. seropedicae* (40%) em relação ao genótipo de pior desempenho (CD 120). No tratamento sem inoculação, os genótipos CD 119 e CD 104 apresentaram uma massa da planta inteira 58% maior comparada ao genótipo de menor performance (CD 120). Em presença unicamente de *H. seropedicae*, os genótipos não apresentam diferenças estatísticas entre si (Tabela 8).

Os dados da produção por planta apontam a cultivar CD 120 como sendo a única que apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Quando na presença unicamente da bactéria (Hs), a produção de grãos por planta foi similar à do tratamento com aplicação de ureia (N) com um aumento de 65% comparada à testemunha. Entre genótipos, o que se destacou foi a cultivar CD 119 com aumentos de 92% em relação ao genótipo CD 120 na testemunha e na presença de (N) e (N+Hs) com a melhor resposta. Na presença da bactéria (Hs), os genótipos tiveram uma produção por planta similar (Tabela 8).

Ao final do ciclo fenológico, uma possível conversão de íons amônio em massa de grãos por planta pode ser correlacionada no genótipo CD 120, embora este não seja o genótipo mais proeminente em características produtivas apresentando a menor massa da planta inteira na testemunha. No entanto, esta cultivar não foi diferente dos demais genótipos quando inoculado com a bactéria (Hs), demonstrando que, entre os avaliados, obteve um comportamento diferencial.

Quanto aos resultados obtidos para massa de 100 grãos, os genótipos CD 108, CD 120 e CD 150 foram similares estatisticamente. A massa de 100 grãos do genótipo CD 104 foi

11% superior na testemunha comparado aos demais tratamentos. É relevante observar que o genótipo CD 119 respondeu à aplicação de nitrogênio apresentando um aumento de 16% na massa de grãos comparada aos tratamentos sob a presença de bactéria e na associação bactéria e nitrogênio (Tabela 8). No comportamento dos genótipos, na testemunha, apenas os genótipos CD104 e CD 119 foram diferentes do CD 108. O CD 119 se destacou por ser entre os genótipos o que mais responde à adubação nitrogenada (36%) e à presença de *H. seropedicae* (16%) quando comparado aos genótipos CD 108 e CD 150, porém, apresentou resultados semelhantes aos outros genótipos sob associação (N + Hs)(Tabela 8).

Tabela 8. Massa da planta inteira ao final do ciclo, produção por planta e massa de 100 grãos de cinco genótipos em função da testemunha, aplicação de nitrogênio (142 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura) (N), inoculação com *H. seropedicae* SmR1 (Hs) e com *H. seropedicae* SmR1 + nitrogênio (N+Hs). COODETEC, Cascavel – PR, 2011.

Genótipo	Testemunha	N	Hs	N+Hs
	Massa da planta inteira ao final do ciclo (g)			
CD 104	9,29 Aa	7,90 Ab	8,63 Aa	8,07 Aab
CD 108	7,78 Aab	6,68 Ab	8,92 Aa	7,86 Aab
CD 119	9,24 ABa	10,60 Aa	8,62 Ba	9,53 ABa
CD 120	5,86 Ab	7,97 Ab	8,70 Aa	6,77 Ab
CD 150	8,17 Aab	8,34 Ab	7,41 Aa	7,63 Aab
C.V. (%)	16,21			
Produção por planta (g/planta)				
CD 104	2,87 Abc	3,03 Ab	2,98 Aa	3,13 Aab
CD 108	2,74 Abc	2,91 Ab	3,32 Aa	3,10 Aab
CD 119	3,89 Aa	4,13 Aa	3,72 Aa	3,64 Aa
CD 120	2,02 Bc	3,24 Aab	3,45 Aa	2,82 ABb
CD 150	2,94 Ab	3,05 Ab	3,07 Aa	3,10 Aab
C.V. (%)	16,36			
Massa de 100 grãos (g)				
CD 104	3,26 Aa	2,88 Bb	2,87 Bab	2,87 Ba
CD 108	2,60 Ab	2,68 Ab	2,64 Ab	2,91 Aa
CD 119	3,36 ABa	3,70 Aa	3,22 Ba	3,13 Ba
CD 120	2,95 Aab	2,78 Ab	2,94 Aab	2,74 Aa
CD 150	3,11 Aab	2,71 Ab	2,75 Ab	2,65 Aa
C.V. (%)	8,34			

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

Lemos (2011) também observou um incremento na massa de 1000 sementes quando a inoculação com *A. brasilense* na cultura do trigo era acompanhada da adubação nitrogenada no CD 150, porém não houve resposta no CD 119.

Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que não houve acréscimos em todos os parâmetros produtivos avaliados, permitindo concluir que esta estirpe bacteriana (*H. seropedicae* SmR1) não estaria atuando como promotora destes. De um modo geral, não é possível indicar uma cultivar mais responsiva, mas levando-se em consideração alguns parâmetros avaliados, podemos propor uma contribuição positiva para a cultivar CD 120, que em outras condições experimentais, a contribuição da associação com a bactéria para a FBN poderá ser melhor estudada.

Na cultura de trigo ainda são escassos os trabalhos demonstrando as respostas da associação com *H. seropedicae* em relação à FBN e promoção do crescimento vegetal (PCV). Neste trabalho foi possível confirmar a importância do efeito genótipo dependente tanto da planta quanto da bactéria para a eficácia da associação. Existe um consenso geral de que o genótipo da planta é um fator chave para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas endofíticas (REIS et al., 2000). Foram observadas respostas diferenciadas entre genótipos de milho inoculadas com *Azospirillum* spp.. Alguns dos genótipos avaliados mostraram uma resposta favorável à inoculação e também à aplicação de 100 Kg ha<sup>-1</sup> de N enquanto que em outros esta resposta foi ínfima (GARCÍA DE SALAMONE et al., 1996).

Outros autores ainda, avaliando a resposta da associação à campo com *A. brasilense* também relatam respostas diferenciadas do trigo dependentes do genótipo, do local, e do estado fenológico das plantas em que foram avaliados (SALA et al., 2007a; DÍAZ-ZORITA e FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2008). Os genótipos avaliados são provenientes do banco de germoplasma da COODETEC e tem origem mexicana (CIMMYT). Díaz-Zorita e Fernández-Canigia (2008) afirmam existir uma diferença na resposta de genótipos europeus em relação aos de origem argentina ou mexicana.

Kennedy et al. (1997) citam que o melhoramento vegetal do trigo visando maiores produtividades foi realizado baseando-se nas melhores respostas dos genótipos à adubação nitrogenada e na alta fertilidade de solos. Este fato poderia ter minimizado a pressão de seleção para o desenvolvimento de uma associação planta-bactéria estável e benéfica em cereais. Por esta razão a procura por germoplasma responsivo à FBN nos genótipos ancestrais não deve ser ignorada.

O genótipo da planta apresenta uma alta correlação com a população de diazotróficos (SILVA et al., 2003). Roesch et al. (2006) afirmam que, além tipo da cultivar o estágio de desenvolvimento do vegetal pode afetar a ocorrência e distribuição das bactérias diazotróficas no milho.

Diaz-Zorita e Fernandez-Canigia (2008) afirmam que a associação do trigo com *Azospirillum brasiliense* aumentou a produção a campo em 8% (um aumento de 260 Kg ha<sup>-1</sup>). Esse aumento não ocorreu pelo aumento do peso de grãos, mas pelo aumento do número de grãos por unidade de área devido a uma maior área foliar. Okon e Labandera-Gonzalez (1994) observaram incrementos na ordem de 5-30% na produção de trigo num período de vinte anos de avaliações em experimentos em campo e em casa de vegetação. Alamri e Mostafa (2009) relatam um aumento na produtividade quando plantas de trigo foram inoculadas com *A. brasiliense* e 60 Kg.ha<sup>-1</sup> de N comparados com plantas não inoculadas.

Além da *Azospirillum sp.*, outros gêneros de bactérias diazotróficas também são relatadas na literatura com bons resultados de FBN e PCV. Shaharoon et al. (2008) observaram aumentos significativos na produção de grãos por planta (22%) e da massa de 1000 grãos (25%) quando bactérias *Pseudomonas fluorescens* foram inoculadas em trigo sem fertilização prévia do solo em casa de vegetação. Outros autores também relatam sobre resultados positivos obtidos de FBN em trigo com a bactéria *Klebsiella pneumoniae* 342 (INIGUEZ et al., 2004).

Outros autores também observaram que diferentes genótipos de trigo diferiram quanto ao aumento de produtividade propiciado por isolados de bactérias do gênero *Azospirillum* e que os maiores benefícios foram obtidos com genótipo e bactéria oriundos da mesma localidade (BHATTARAI e HESS, 1993).

Baldani et al. (1986) testaram em trigo diferentes estirpes de origens diversas e concluíram que estirpes homólogas foram mais eficientes do que as isoladas de plantas de outras espécies. Como a *H. seropedicae* foi isolada de raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1992), este fato poderia explicar a pouca aptidão desta estirpe em realizar a FBN em trigo.

Outra razão que possivelmente poderia explicar os resultados pouco expressivos de FBN, promoção do crescimento vegetal e produtividade da associação planta-bactéria, seria a alta fertilidade do solo usado nesse experimento (M.O.=52,27 g.dm<sup>-3</sup>). Os resultados obtidos sugerem que o nitrogênio disponível no solo pode ter sido por si só, suficiente para o desenvolvimento das plantas de trigo, minimizando a contribuição da FBN e dos efeitos promotores de crescimento nas plantas avaliadas.

Oliveira et al. (2006) observaram que a associação de diferentes bactérias diazotróficas e cana-de-açúcar em diferentes tipos de solo (em relação a fertilidade) foi distinta e solos com alta fertilidade não geraram resultados de FBN ou PCV, sendo que os melhores resultados

foram encontrados nos solos de média e baixa fertilidade. Outros autores também observaram que o tipo de solo teve uma forte influência na densidade e estrutura populacional microbiana em plantas de milho (CHIARINI et al., 1998), ou ainda sob estresse abiótico (CREUS et al., 2004).

A relação associativa entre o trigo e a bactéria diazotrófica *H. seropedicae* não foi completamente elucidada. Este trabalho representa o primeiro trabalho com dados de estudos de parâmetros agronômicos realizado com genótipos COODETEC, importantes para a região oeste do Paraná. Autores comentam a baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos para a FBN em muitas culturas (OKON e LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994; DOBBELAERE et al., 2003). O uso comercial da inoculação com *H. seropedicae* em cereais requer mais estudos críticos devido ao grande número de variantes que esta prática apresenta (OLIVEIRA et al., 2006). Apesar da FBN não ter sido o fator principal encontrado, os resultados obtidos nesse estudo reforçam e justificam mais estudos sobre estratégias e metodologias para seleção de estirpes bacterianas e genótipos de trigo mais responsivos a esta associação.

## 5 CONCLUSÕES

Foi observada a associação da planta e da *H. seropedicae in vitro* pela ocorrência de aumento da zona pilífera em alguns genótipos avaliados.

As cultivares CD 105, CD117 e CD 120, pela presença da bactéria *H. seropedicae* SmR1 endofiticamente e promoção do crescimento radicular, são as cultivares mais promissoras para uma resposta à FBN.

Os níveis de  $\text{NH}_4^+$ , GS e NT nas raízes não foram determinantes para a PCV e FBN *in vitro* nos genótipos e no período de co-cultivo avaliado.

Nos experimentos em casa de vegetação, não foi observado nenhum efeito negativo da inoculação nas cultivares avaliadas com *H. seropedicae*.

Apesar de ter havido uma interação significativa tanto entre tratamentos por genótipo, como entre genótipos por tratamentos para as variáveis avaliadas estas, não foram determinantes para a definição de um genótipo em especial que apresente uma resposta conclusiva a respeito da interação benéfica planta-bactéria.

Os parâmetros produtivos avaliados não denotam uma proeminente resposta à inoculação com *H.seropedicae* dos genótipos COODETEC.

Existe uma possível contribuição a ser mais bem estudada da associação na cultivar CD 120, apesar de seu menor desempenho comparado aos demais genótipos.

Perspectivas: Existe a necessidade de se identificar estirpe(s) específica(s) para os genótipos COODETEC. Outro ponto será o melhoramento genético desta cultura envolvendo a busca de ancestrais responsivos para a promoção do crescimento vegetal e FBN.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAMRI, S. A. e 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**, v.16, n.2, p.101-107. 2009.

ANTONYUK, L. e EVSEEVA, N. Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. **Microbiology**, v.75, n.4, p.470-475. 2006.

ARSHAD, M. e FRANKENBERGER JR, W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v. 62, p.45-151. 1998.

BALDANI, J. I. e BALDANI, V. L. D. History an the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.77, n.3, p.549-579. 2005.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International journal of systematic bacteriology**, v.36, n.1, p.86-93. 1986.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5-6, p.911-922. 1997.

BALDANI, J. I.; POT, L. B.; KIRCHHOF, G. et al. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, n.3, p.802-810. 1996.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, n.5-6, p.485-491. 2000.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. et al. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v.13, p.65-73. 1992.

BALSANELLI, E.; SERRATO, R. V.; DE BAURA, V. A. et al. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v.12, n.8, p.2233-2244. 2010.

BANERJEE, M. e YESMIN, L. Sulfur-oxidizing plant growth promoting *Rhizobacteria* for enhanced canola performance. **US Patent**. 2002.

BARKA, E. A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia*

*phytofirmans* strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.11, p.7246-7252. 2006.

BARKER, A. V. e BRYSON, G. M. Nitrogen. In: BARKER, A. V. e PILBEAM, D. J. (Ed.). **Handbook of Plant Nutrition**. New York: CRC Taylor & Fracis Group. Nitrogen, p.613 2007. (Books in soils, plants and the environment)

BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L.; LADHA, J. K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, n.1, p.15-24. 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; FERRERA CERRATO, R. Interacciones entre plantas y microorganismos beneficios II. Bacterias asociativas de la rizosfera. **Terra** v.14, n.2, p.195-210. 1996.

BASHAN, Y. e LEVANONY, H. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v.137, n.1, p.99-103. 1991.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, n.1, p.7-11. 1998.

BELL, M. A.; FISCHER, R. A.; BYERLEE, D. et al. Genetic and agronomic contributions to yield gains: A case study for wheat. **Field Crops Research**, v.44, n.2-3, p.55-65. 1995.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K. et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology** v.39, n.3, p.311-320. 2008.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, n.1, p.11-18. 2009.

BERNARD, S. M.; MOLLER, A. L.; DIONISIO, G. et al. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Mol Biol**, v.67, n.1-2, May, p.89-105. 2008.

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

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological biotechnology**, v.80, p.199-209. 2008.

BHATTARAI, T. e HESS, D. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. **Plant and Soil**, v.151, n.1, p.67-76. 1993.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p.195-209. 1995.

- BRAMMER, S. P.; MARTINELLI, P.; MORAIS-FERNANDES, M. I. B. et al. A potencialidade de *Agropyron*, espécie afim ao trigo cultivado, como fonte de introgressão de genes agronomicamente importantes. **Documentos online; 08**. Secondary BRAMMER, S. P.; MARTINELLI, P.; MORAIS-FERNANDES, M. I. B. et al. Passo fundo: Embrapa Trigo: 8 p. 2001.
- BRAUTIGAM, A.; GAGNEUL, D.; WEBER, A. P. High-throughput colorimetric method for the parallel assay of glyoxylic acid and ammonium in a single extract. **Analytical Biochemistry**, v.362, n.1, Mar 1, p.151-3. 2007.
- BREMNER, J. M. e MULVANEY, C. S. Nitrogen total. In: PAGE, A. L., MILLER, R. H., et al (Ed.). **Methods of soil analysis: Part 2, Chemical and Microbiological Properties**. Madison: American Society of Agronomy/Soil Science Society of America. Nitrogen total, p.595-624 1982
- BRITTO, D. T. e KRONZUCKER, H. J. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, v.159, n.6, p.567-584. 2002.
- BRUSAMARARELLO, L. C. C., **Sequenciamento e análise de sequências expressas (ESTs) de arroz (*Oryza sativa*) inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2007, 69 p. Dissertação de Mestrado Dep. Genética - Universidade Federal do Paraná.
- BURRIS, R. Nitrogenases. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.15, May 25, 1991, p.9339-9342. 1991.
- CAFÉ, S. L.; FONSECA, P. S. M. D.; AMARAL, G. F. et al. **Cadeia produtiva do trigo: BNDES Setorial**. 2003. 193-220 p.
- CAMARGO, C. E. D. O.; FILHO, A. W. P. F.; FELICIO, J. C. et al. Linhagens diaplóides de trigo: desempenho agrônomo em dois locais do estado de São Paulo e tolerância à toxicidade de alumínio em laboratório. **Bragantia**, v.65, n.2, p.253-268. 2006.
- CAPUTO, C.; CRIADO, M. V.; ROBERTS, I. N. et al. Regulation of glutamine synthetase 1 and amino acids transport in the phloem of young wheat plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, n.5, p.335-342. 2009.
- CHAVES, D. F. S.; FERRER, P. P.; SOUZA, E. M. et al. A two-dimensional proteome reference map of *Herbaspirillum seropedicae* proteins. **Proteomics**, v.7, n.20, p.3759-3763. 2007.
- CHENG, H.-R. e JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters**, v.28, n.1, p.55-59. 2006.
- CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C. et al. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology**, v.8, n.1-3, p.11-18. 1998.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.4, p.840-862. 2004.

COCKING, E. C. OBPC Symposium: Maize 2004 & beyond: intracellular colonization of cereals and other crop plants by nitrogen-fixing bacteria for reduced inputs of synthetic nitrogen fertilizers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.41 n.4, p.369-373 2005.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J. et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.4951-4959. 2005.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos 2009/2010, Décimo primeiro levantamento - Agosto, 2010**. Brasília: Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. 2010. 46 p.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira 2010/2011: grãos, Quarto levantamento - Janeiro, 2011**. Brasília: Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. 2011. 46 p.

COUTO, G. H., **Expressão e purificação da proteína *glnD* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2005, 112 p. Dissertação. Dep. de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná.

CREN, M. L. e HIREL, B. Glutamine Synthetase in Higher Plants Regulation of Gene and Protein Expression from the Organ to the Cell. **Plant and Cell Physiology**, v.40, n.12, January 1, 1999, p.1187-1193. 1999.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v.82, n.2, p.273-281. 2004.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV - Universidade Federal de Viçosa. 2001. 648 p.

CURTIS, B. C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, H. G. **Bread Wheat Improvement and production**. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations, v.30. 2002. 554 p.

DÍAZ-ZORITA, M. e FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, v.45, n.1, p.3-11. 2008.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, n.2, p.107 - 149. 2003.

DÖBERAINER, J.; BALDANI, V. L. D.; URQUIAGA, S. Importance of biological dinitrogen fixation for biofuel programmes. International symposium on sustainable

agriculture for the tropics: the role of biological nitrogen fixation. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1995. 108 p.

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

DONATO, V. M. T. S. e ANDRADE, A. G. D. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1087-1093. 2004.

EL-KOMY, H. M.; SAAD, O. A.; HETTA, A. M. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using 15N-dilution method. **Folia microbiologica**, v.48, n.6, p.787-793. 2003.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T. et al. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* spp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.11, Nov, p.5285-93. 2001.

EMAM, Y. e BORJIAN, A. R. Yield and yield components of two winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars in response to rate and time of roliar urea application. **Journal of Agricultural Science of Technology**, v.2, n.4, p.263-270. 2000.

EMBRAPA-TRIGO. Importações 2008: principais origens por quantidade exportada. 2008. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/trigo2008.pdf> Acesso em: 06 mai. 2011.

EMBRAPA/CNPT. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Cultura do trigo. 2011. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso em: 06 mai. 2011.

FAOSTAT. Base de dados estatísticos da agricultura mundial. Top production wheat 2008. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Acesso em: 06 mai. 2011.

FEUILLETA, C. e EVERSOLEB, K. Physical mapping of the wheat genome: a coordinated effort to lay the foundation for genome sequencing and develop tools for breeders. **Israel Journal of Plant Sciences**, v.55, n.3-4, p.307-313. 2007.

FRANCO, F. D. A.; PINTO, R. B.; PELIZZARRO, K. et al. Marcador molecular ligado a um gene recessivo que controla dormência das sementes em trigo. **54º Congresso Brasileiro de Genética**. Seco ndary FRANCO, F. D. A.; PINTO, R. B.; PELIZZARRO, K. et al. Salvador - BA - Brasil: Sociedade Brasileira de Genética 2008.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J. et al. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, n.2, p.117-128. 1999.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R. et al. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**, v.154, n.2, p.145-150. 1993.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.23, n.3, p.249-256. 1996.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, n.2, p.109-117. 1995.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v.251, n.1, p.1-7. 2005.

GONZÁLES, H. H. S., **Caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas isoladas de *Saccharum* sp. (cana-de-açúcar) cultivadas sob adubação orgânica ou fertilizante nitrogenado ou sem adubação.** São Paulo, 2008, 141 p. Tese de doutorado. Dep. de Biotecnologia - Universidade São Paulo.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S.-W. et al. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, v.55, n.1, p.21-37. 2008.

GRAHAM, P. H. e VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v.131, n.3, p.872-877. 2003.

GUIMARÃES, S. L.; CAMPOS, D. T. S.; BALDANI, V. L. D. et al. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v.23, n.4, p.32-39,. 2010.

HAAS, D. e DEFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.4, p.307-319. 2005.

HALBLEIB, C. M. e LUDDEN, P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. **Journal of Nutrition**, v.130, n.5, p.1081-1084. 2000.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, v.48, n.2, Aug, p.422-7. 1972.

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

HOWARTH, R.; ANDERSON, D.; CLOERN, J. et al. Nutrient pollution of coastal rivers, bays and seas. **Issues in Ecology**, v.7, p.2-15. 2000.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, n.10, p.1078-85. 2004.

- JACKSON, A. O. e TAYLOR, C. B. Plant-microbe interactions: life and death at the interface. **Plant Cell**, v.8, n.10, Oct, p.1651-1668. 1996.
- JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.65, n.2-3, p.197-209. 2000.
- JAMES, E. K. e OLIVARES, F. L. **Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs**. Philadelphia, PA, ETATS-UNIS: Taylor & Francis. 1998. 119 p.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. et al. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotrophic colonising vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.785-797. 1997.
- JEYABAL, A. e KUPPUSWAMY, G. Recycling of organic wastes for the production of vermicompost and its response in rice-legume cropping system and soil fertility. **European Journal of Agronomy**, v.15, n.3, p.153-170. 2001.
- KATIYAR, V. e GOEL, R. Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. **Plant Growth Regulation**, v.42, n.3, p.239-244. 2004.
- KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, n.8, p.1229-1244. 2004.
- KENNEDY, I. R.; PEREG-GERK, L. L.; WOOD, C. et al. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v.194, n.1, p.65-79. 1997.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008
- KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n.3, p.473-480. 2004.
- KHODARAHMI, M.; NABIPOUR, A.; ZARGARI, K. Genetic improvement of agronomic and quality traits of wheat cultivars introduced to temperate regions of Iran during 1942 - 2007. **African Journal of Agricultural Research**, v.5, n.9, p.947-954. 2010.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M. et al. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.157-168. 2001.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.9, p.887-891. 1997.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, n.12, p.1244-51. 2004.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; HOLTZ, É. K. et al. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solução nutritiva e câmara de crescimento. **Revista da FZVA**, v.14, n.2, p.23-33. 2007.

LANCIEN, M.; GADAL, P.; HODGES, M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. **Plant Physiol**, v.123, n.3, Jul, p.817-24. 2000.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACION, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M. et al. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome *c* biogenesis Genes. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.16, p.5384-5391. 2004.

LEMOS, J. M., **Resposta de cultivares de trigo à inoculação em sementes com *Azoopirillum brasilense*, e à adubação nitrogenada em cobertura.** Marechal Cândido Rondon, 2011, 62 p. Dissertação, Dep. Agronomia - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE.

LIMAMI, A.; PHILLIPSON, B.; AMEZIANE, R. et al. Does root glutamine synthetase control plant biomass production in lotus japonicus L.? **Planta**, v.209, n.4, Oct, p.495-502. 1999.

LONG, H. H.; SONNTAG, D. G.; SCHMIDT, D. D. et al. The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception. **New Phytologist**, v.185, n.2, p.554-67. 2010.

LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. **TERRA Latinoamericana**, v.22, n.2, p.225-239. 2004.

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J. et al. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.961-970. 1998.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição Mineral de Plantas.** São Paulo: Editora Agronomica Ceres Ltda. 2006. 251 p.

MARCHIORO, V. S.; FRANCO, F. D. A.; NORA, T. D. et al. CD 117: nova cultivar de trigo de ampla adaptação. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.424-426. 2009.

MARIANO, R. D. L. R.; SILVEIRA, E. B. D.; ASSIS, S. M. P. D. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 1, p.89-111. 2004.

- MARX, J. The roots of plant-microbe collaborations. **Science**, v.304, n.5668, p.234-206. 2004.
- MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, n.3, p.253-263. 2009.
- MOOLHUIJZEN, P.; DUNN, D. S.; BELLGARD, M. et al. Wheat genome structure and function: genome sequence data and the International Wheat Genome Sequencing Consortium. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.58, n.6, p.470-475. 2007.
- MOORE, F. P.; BARAC, T.; BORREMANS, B. et al. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.7, p.539-556. 2006.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B. Citogenética. In: OSÓRIO, E. A. (Ed.). **Trigo no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill v.1. Citogenética, p.95-143 1982
- MORAES-FERNANDES, M. I. B. D.; ZANATTA, A. C. A.; PRESTES, A. M. et al. Cytogenetics and immature embryo culture at Embrapa-Trigo breeding program: transfer of disease resistance from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, p.1051-1062. 2000.
- MOREY, K. J.; ORTEGA, J. L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Cytosolic glutamine synthetase in soybean is encoded by a multigene family, and the members are regulated in an organ-specific and developmental manner. **Plant Physiology**, v.128, n.1, Jan, p.182-93. 2002.
- MOUTIA, J. F. Y.; UMRIT, G.; SAUMTALLY, A. S. et al. The role of diazotrophic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cane in mauritius: Preliminary results. **AMAS 2003. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius.**, p.29-39. 2003.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with *Tobacco* tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497. 1962.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G. et al. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, n.3, p.277-86. 2005.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M. et al. N-fertilizer saving by inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, v.161, p.238-245. 2006.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LOGANATHAN, P. Effect of inorganic N on the population, in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). **Plant and Soil**, v.243, p.91-102. 2002.

- NEIVERTH, A.; SILVA, J. B.; SCHUSTER, I. et al. Regeneration of wheat plants from wheat (*Triticum aestivum* L. cv CD104) mature embryos. **Scientia Agraria**, v.11, n.2, p.101-108. 2010.
- NOGUEIRA, E. M.; OLIVARES, F. L.; JAPIASSU, J. C. et al. Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. **Plant Science**, v.169, n.5, p.819-832. 2005.
- OKON, Y. e LABANDERA-GONZÁLEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, n.12, p.1591-1601. 1994.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, n.3, p.197-200. 1996.
- OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. et al. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v.135, n.4, p.723-737. 1997.
- OLIVEIRA, A. D.; CANUTO, E. D. L.; URQUIAGA, S. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v.284, n.1, p.23-32. 2006.
- OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M. et al. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v.45, n.1, p.106-113. 2009.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. et al. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, n.2, p.205-215. 2002.
- PAUX, E.; SOURDILLE, P.; SALSE, J. R. M. et al. A Physical Map of the 1-Gigabase Bread Wheat Chromosome 3B. **Science**, v.322, n.5898, October 3, 2008, p.101-104. 2008.
- PAYNE, P. I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. **Annual Review of Plant Physiology**, v.38, n.1, p.141-153. 1987.
- PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n.1, p.25-35. 2008.
- PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v.7, n.5, May, p.e1002064 (1-10). 2011.
- PERIN, L., **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. Seropédica, RJ, 2007, 88 p. Tese de Doutorado. Dep. Agronomia - Ciência do Solo - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **Aspectos Genéticos e Moleculares Na Interação Entre Organismos Patogênicos E Diazotróficos Em Cana-De-Açúcar**. Seropédica/RJ, v.233. 2007. 41 p.

PIERIK, R.; THOLEN, D.; POORTER, H. et al. The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends in Plant Science**, v.11, n.4, p.176-183. 2006.

RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJN, I.; DE KOCK, M. J. D. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, n.7, p.699-710. 2006.

RADWAN, T.; EL-SAYED, E.-D.; MOHAMED, Z. K. et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum e Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.987-994. 2004.

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

RAPPEL, E. e LOIOLA, E. Estudo da Competitividade da Indústria Brasileira. In: COUTINHO, L. G. (Ed.). **Competitividade da Indústria de Fertilizantes. Nota Técnica Setorial do Complexo Químico**. Campinas: MCT, FINEP, PADCT. Estudo da Competitividade da Indústria Brasileira, p.79 1993

REINHOLD-HUREK, B. e HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v.6, n.4, p.139-144. 1998.

REIS, A. R.; FAVARIN, J. L.; GALLO, L. A. et al. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.315-324. 2009.

REIS JUNIOR, F. B. D.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. et al. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v.219, n.1, p.153-159. 2000.

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

RENGEL, Z. Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. **Plant and Soil**, v.196, n.2, p.255-260. 1997.

REYNOLDS, M. P.; DELGADO B, M. I.; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M. et al. Photosynthesis of wheat in a warm, irrigated environment: I: Genetic diversity and crop productivity. **Field Crops Research**, v.66, n.1, p.37-50. 2000.

ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. et al. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, v.302, n.1, p.91-104. 2008.

- ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F.; PEREIRA PASSAGLIA, L. et al. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.9, p.967-974. 2006.
- ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M. et al. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.66, n.1, Oct, p.85-95. 2008.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I. et al. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and evolutionary microbiology**, v.56, n.6, June 1, 2006, p.1341-1348. 2006.
- SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G. D. et al. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.6, p.833-842. 2007a.
- SALA, V. M. R.; FREITAS, S. D. S.; DONZELI, V. P. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.345-352. 2005.
- SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas. In: SILVEIRA, A. P. D. D. e FREITAS, S. D. S. (Ed.). **Microbiologia do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas, p.97-115, 2007b
- SALOMONE, I. G. e DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, p.193-196. 1996.
- SANTOS, M. F. D.; MUNIZ DE PADUA, V. L.; DE MATOS NOGUEIRA, E. et al. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. **J Proteomics**, v.73, n.5, p.917-31. 2010.
- SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J. et al. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, Jun 17. 2007.
- SARITA, S.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J. et al. Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science**, v.94, n.1, p.109-115. 2008.
- 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, n.2, p.215-222. 2002.
- SCHJOERRING, J. K.; HUSTED, S.; MACK, G. et al. The regulation of ammonium translocation in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.883-890. 2002.
- SCHLESINGER, W. H. **Biogeochemistry: an analysis of global change**. San Diego: Academic Press. 1997. 588 p.

SCHMID, M. e HARTMANN, A. Molecular phylogeny and ecology of root associated diazotrophic  $\alpha$ - and  $\beta$ -proteobacteria. In: ELMERICH, C. e NEWTON, W. E. (Ed.). **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Association**: Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Molecular phylogeny and ecology of root associated diazotrophic  $\alpha$ - and  $\beta$ -proteobacteria, p.1-20, 2003

SCHMIDT, D. A. M.; CARVALHO, F. I. F. D.; OLIVEIRA, A. C. D. et al. Variabilidade genética em trigos brasileiros a partir de caracteres componentes da qualidade industrial e produção de grãos. **Bragantia**, v.68, n.1, p.43-52. 2009.

SCHOLTER, M. e HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with train-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, v.25, p.159-179. 1998.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology**, v.42, n.2, p.155-159. 2006.

SHAHAROONA, B.; NAVEED, M.; ARSHAD, M. et al. Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, n.1, p.147-155. 2008.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R.; HERBERT TABOR AND CELIA WHITE, T. [130] Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. 17, Part 1. [130] Glutamine synthetase (*Escherichia coli*), p.910-922 1970

SILVA, K. R. A. D.; SALLES, J. F.; SELDIN, L. et al. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, n.2, p.213-231. 2003.

SOARES, R. A.; ROESCH, L. F. W.; ZANATTA, G. et al. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, v.33, n.3, p.221-234. 2006.

SOBRINHO, J. S. e SOUZA, M. A. Origem, descrição botânica e desenvolvimento do trigo. **Informe Agropecuario**, v.97, p.9-13. 1983.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v.312, n.1, p.15-23. 2008.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2009. 848 p.

TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R. et al. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: some implications in the association with endophytes. **Journal of Plant Physiology**, v.163, n.1, p.80-85. 2006.

TEJERA, N. A.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. et al. Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.9, p.745–750. 2004.

UNNO, Y.; OKUBO, K.; WASAKI, J. et al. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. **Environ Microbiol**, v.7, n.3, Mar, p.396-404. 2005.

UTKHEDE, R. S.; KOCH, C. A.; MENZIES, J. G. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.21, n.3, p.265-271. 1999.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C. et al. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.979–1983. 2003.

VAN LOON, L. Plant responses to plant growth-promoting bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, n.3, p.243-254. 2007.

VARGAS, C.; PÁDUA, V. L. M.; NOGUEIRA, E. M. et al. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. **Symbiosis**, v.35, p.159-180. 2003.

VINCENT, R.; FRAISIER, V.; CHAILLOU, S. et al. Overexpression of a soybean gene encoding glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. **Planta**, v.201, p.424-433. 1997.

WAIRIU, M. e LAL, R. Soil organic carbon in relation to cultivation and topsoil removal on sloping lands of Kolombangara, Solomon Islands. **Soil and Tillage Research**, v.70, n.1, p.19-27. 2003.

WANG, Z. Q.; YUAN, Y. Z.; OU, J. Q. et al. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. **Journal of Plant Physiology**, v.164, n.6, p.695-701. 2007.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.81, n.1, p.357-364. 2002.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.1, p.487-511. 2001.

WICHERN, F.; EBERHARDT, E.; MAYER, J. et al. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: methods, estimates and future prospects. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, n.1, p.30-48. 2008.

YOUSSEF, H.; FAYEZ, M.; MONIB, M. et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, n.6, p.391-397. 2004.

ZAKHAROVA, E. A.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. **European Journal of Biochemistry**, v.259, n.3, p.572-576. 1999.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W. et al. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.21, Nov, p.6781-8. 1993.