

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



"Aspectos do mecanismo de ação fisiológica associado à promoção do crescimento radicular de trigo (*Triticum aestivum* L.) por bactérias do gênero *Azospirillum*."

Agostinho Dirceu Didonet (nt)
Pesq. Embrapa-CNPTrigo

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Agostinho Dirceu Didonet e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal.

14/12/93

Acun

Orientador: Prof. Dr. Antônio Celso N. Magalhães. (t)

CAMPINAS
1993

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor Antônio C. N. Magalhães, pelo estímulo, convivência e por jamais deixar de acreditar nos resultados do trabalho.

Aos professores Ivany Válio, Ladaslav Sodek e Claudia Haddad, pelas sugestões e opiniões.

Ao professor Paulo Arruda, pelo apoio e pelas facilidades de laboratório e material do CBMEG -UNICAMP, colocadas à disposição.

Aos colegas, amigos e funcionários do CBMEG, por tornarem os dias e noites de trabalho bem mais amenas.

Ao CEPAGRI (Centro de Ensino e Pesquisa em Agricultura), pelo uso de microcomputadores e impressora.

Ao colega Celso Jamil Marur, pela amizade e ensinamentos no uso do microcomputador.

Aos colegas e amigos do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo companheirismo e convivência.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela colaboração em todos os momentos.

À CAPES e CNPQ, pelo apoio financeiro.

À amiga Ivone, pela força e apoio em todos os momentos.

À dona Olinda, pela inestimável ajuda.

Aos meus filhos Silvana, Karina e Felipe pela ausência quase infindável, e razão de todos os meus esforços.

Dedico....

A meus pais Luiz e Lúcia.

A meus filhos Silvana, Karina e Felipe.

ÍNDICE	Página
AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	viii
I - INTRODUÇÃO	01
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
III - MATERIAIS E MÉTODOS	11
1 - Origem das bactérias	11
2 - Crescimento das bactérias	11
2.1 - Crescimento em meio líquido	11
2.2 - Crescimento em meio NFb semi-sólido	11
2.3 - Contagem do número de células	12
2.4 - Meio de crescimento para determinação de IAA (Ácido Indolil-3-Acético)	12
2.5 - Teste para <i>nir</i> (nitrito redutase)	12
2.6 - Teste para crescimento com glicose	12
3 - Determinação do teor de oxigênio dissolvido no meio	13
4 - Determinação de nitrito	13
5 - Determinação de IAA	13
6 - Crescimento das plântulas	14
6.1 - Solução nutritiva de MARSCHNER <i>et al.</i> ,(1982)	14
7 - Obtenção do sobrenadante das bactérias para teste com os segmentos de raiz de trigo	15
8 - Origem das sementes de trigo	15
8.1 - Esterilização das sementes	15
9 - Determinação do peso da matéria fresca, comprimento e número de raízes	15
10 - Avaliação do peso da matéria fresca de segmentos de raiz de trigo	16
11 - Determinação do efluxo de prótons	16
12 - Tratamento com drogas farmacológicas	17

IV - RESULTADOS	19
1 - Fisiologia e crescimento do <i>Azospirillum</i>	19
2 - Associação <i>Azospirillum</i> /raiz de trigo	26
2.1 - Inoculação das sementes: efeito no desenvolvimento do sistema radicular	26
2.2 - Acidificação do meio de crescimento das plântulas	27
3 - Crescimento de segmentos de raiz	30
3.1 - Efeito do IAA e nitrito	30
3.2 - Efeito do sobrenadante do meio de crescimento da JA03	30
4 - Efluxo de prótons em raízes intactas: efeito de IAA e nitrito	32
5 - Efeito de drogas farmacológicas no crescimento de segmentos induzidos por IAA ou nitrito	33
6 - Efeito de reagentes SH no crescimento de segmentos induzidos por IAA e nitrito	34
V - DISCUSSÃO	37
VI - LITERATURA CITADA	51

RESUMO

A utilização de bactérias promotoras do crescimento radicular (PGPR) do gênero *Azospirillum*, em associação com raízes de trigo, mostrou-se capaz de promover o crescimento da planta, aumentando a produtividade. O modo de ação pelo qual estas bactérias atuam no desenvolvimento radicular ainda não está perfeitamente esclarecido. Várias propostas têm sido encaminhadas na tentativa de explicar os fenômenos relacionados à promoção do crescimento por bactérias da rizosfera, dentre as quais a maior eficiência de absorção de nutrientes e de água, a intensificação da fixação biológica do N_2 e os efeitos de substâncias com atividade hormonal, são mais frequentemente citadas. Isoladamente, nenhuma das opções descritas são suficientes para o esclarecimento dos mecanismos de ação destas bactérias na promoção do crescimento.

No presente trabalho foram utilizadas três diferentes estirpes de *Azospirillum*: JA03 - *Azospirillum lipoferum* e JA04 - *Azospirillum brasilense*, isoladas da região tritícola do Rio Grande do Sul; e a 245 - *Azospirillum brasilense*, utilizada como referência, em função dos seus já conhecidos efeitos.

Experimentos iniciais, demonstraram que colônias da estirpe JA03 apresentaram maior capacidade de multiplicação em temperaturas mais baixas (28 - 30°C), e produziram maior quantidade de ácido indolil-3-acético (IAA), tanto na presença quanto na ausência de 100 mg/l de triptofano, do que as estirpes JA04 e 245. Além disso, a estirpe JA03 demonstrou alta capacidade de utilizar nitrato para a respiração, em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, acumulando até 800 µg/ml de nitrito no meio, sem afetar o seu crescimento. Esta quantidade de nitrito foi pelo menos 20 vezes superior ao produzido pelas demais estirpes testadas.

A inoculação das sementes de trigo com estas estirpes, mostrou que todas induziram aumento no comprimento radicular de plântulas estioladas que variaram de 33,3 até 47,5%, em relação ao controle, e também causaram maior ramificação radicular (4,8 até 18,3%), com destaque para as plântulas inoculadas com a estirpe JA03.

Tendo em vista que estas bactérias colonizam a rizosfera e os espaços intercelulares das raízes de plântulas inoculadas, e que seus efeitos sobre o crescimento da raiz pressupõe intensa atividade, o primeiro encaminhamento experimental foi dirigido ao estudo da ação da inoculação na extrusão de prótons pelo sistema radicular. Nas situações testadas, a inoculação com a estirpe JA03 promoveu maior acidificação do meio de crescimento radicular (100,8%), além de apresentar menor sensibilidade à presença de orto-vanadato, um inibidor da atividade da H⁺-ATPase da plasmalema, em relação às plântulas não inoculadas. Considerando que um dos pré-requisitos conhecidos para a ocorrência de alongamento celular é a acidificação da parede celular (teoria do crescimento ácido), foi investigado o fenômeno de extrusão de prótons associado ao efeito do IAA e também do nitrito, uma vez que a estirpe JA03 apresenta capacidade de produzir ambas as substâncias em meio de cultura. A adição de IAA ou nitrito no meio de crescimento de raízes de plântulas de trigo provocou um aumento significativo da acidificação do ambiente das raízes, sendo que o efeito do IAA foi mais sensível à presença de orto-vanadato do que o do nitrito.

Utilizando segmentos de raiz de plântulas de trigo, obtidos da região de alongamento radicular, foi possível demonstrar que a adição de IAA e de nitrito, na concentração de 10⁻⁷M, induziu aumento do crescimento do tecido, sendo que o efeito permaneceu até 48h após a incubação. Efeito similar foi demonstrado quando se utilizou o sobrenadante da estirpe JA03 crescida em meio contendo nitrato, que acumulou 363,6 µg/ml de nitrito, numa diluição que correspondeu a 0,8 x 10⁻⁷M de nitrito. O sobrenadante do meio de multiplicação desta bactéria, quando crescida em meio contendo amônia, não apresentou nenhum efeito no crescimento. A utilização de Procaína, um anestésico de ação local, adicionada no meio de incubação dos segmentos de raiz, afetou em menor escala (cerca de 50%) o crescimento mediado por IAA, e quase totalmente o efeito mediado por nitrito. Esta ação, associada ao efeito do orto-vanadato, demonstrou a existência das duas fases de crescimento associadas ao efeito da auxina, e indicou que o efeito do nitrito está associado à manutenção de um potencial transmembrana.

A adição de trifluorperazina (TFP), um antagonista da Ca-calmodulina, inibiu o crescimento dos segmentos tratados com IAA e nitrito, porém de forma mais pronunciada o efeito devido ao nitrito. Este efeito do TFP, indica, provavelmente,

o envolvimento de mensageiros metabólicos específicos, tais como Ca^{2+} e eventualmente fosfoinosítídeos (IP_3), nas respostas ao crescimento mediado por IAA e nitrito. Além disso, a utilização de reagentes de grupamentos sulfidrílicos de proteínas com diferentes permeabilidades na membrana, como NEM (N-etilmaleimida), diamida, Iaa (iodoacetamida) e p-HMB (p-hidroximercuribenzoato), sugerem que tanto a resposta devida à IAA como nitrito, estão associadas à proteínas com grupamentos SH essenciais. Iaa, NEM, diamida e p-HMB inibiram o crescimento mediado por nitrito e afetaram parcialmente a resposta devida ao IAA. p-HMB anulou completamente o efeito de ambos IAA e nitrito.

Nossos resultados sugerem que, aparentemente, os efeitos do IAA e nitrito no crescimento são comandados por diferentes mecanismos; enquanto IAA apresenta uma primeira fase de resposta, de curta duração, relacionada com o relaxamento da parede celular, e a segunda resposta, de longa duração, dependente da incorporação de material de parede celular, o efeito do nitrito parece estar mais associado à resposta de longa duração, que também provoca relaxamento de parede celular.

ABSTRACT

Several experimental evidences have indicated that the association of the soil-borne bacteria of the genus *Azospirillum* with wheat roots can promote plant growth. Inoculation of *Azospirillum* strains in etiolated wheat seedlings induced significant elongation of the primary root (one strain), in addition to lateral root differentiation (another strain). Our results suggest that the response of bacteria inoculation is probably associated with the capacity of some nitrate-grown bacteria strains to produce appreciable amounts of Indol Acetic Acid (IAA) and nitrite, the latter being released into the external medium, particularly under the lower oxygen concentration prevailing in the rhizosphere.

The hormonal-like nitrite effects have been investigated, both in intact seedlings and root segments. When the diffusate of bacteria medium was added to root segments active elongation occurred, the effect extending up to 24 hours or 48 hours of incubation. Comparable effects were observed as exogenous nitrite was supplied to the root medium, the maximum response measured at 10^{-7} M concentration. Treatment with 10^{-7} M IAA induced essentially the same response.

The evaluation of the extent of acidification of the root medium showed that both IAA and nitrite cause proton extrusion, which was inhibited by orto-vanadate solely in the IAA-treated segments. IAA promotion of root elongation was inhibited by Procaine (a membrane depolarizing compound), nitrite-induced root growth being less affected. The IAA-induced growth response seems strictly dependent upon active H^+ extrusion, whereas nitrite effect might be linked to the existing transmembrane potential.

Incubation of the root segments with sulphydryl agents that present differential membrane permeation characteristics, such as Iodoacetamide (Iaa), N-ethylmaleimide (NEM), Diamide and p-hydroxymercuriobenzoate (p-HMB), suggested that both IAA and nitrite effects might be associated with SH-proteins. Nitrite-induced growth was inhibited by Iaa, NEM, Diamide and p-HMB, whereas IAA-dependent elongation was affected to a lesser extent by the three former compounds; p-HMB completely abolished the growth response of both IAA and nitrite.

The promotion of root growth by exogenously supplied IAA and nitrite decreased in segments treated with Trifluoperazine (TFP), a Ca-Calmodulin antagonist, the inhibition being more pronounced in the nitrite treatment.

Our data suggest that nitrite and IAA effects are governed by somewhat distinct mechanisms: IAA is particularly effective on the short-term growth response (1st response) in addition to the long-term growth response (2nd response), leading to wall loosening and matrix incorporation, respectively. Nitrite affects longer term events which also result in wall relaxation. The TFP effects probably indicate the requirement of specific metabolic messengers, such as Ca²⁺ and eventually Phosphoinositides-IP₃ (Li⁺ effect), for hormonal-signaling root growth processes.

I - INTRODUÇÃO

Embora bastante estudada, a prática da utilização de rizobactérias do gênero *Azospirillum*, promotoras do crescimento de plantas, ainda não é utilizada a nível de campo. O uso da inoculação de sementes de cereais, principalmente trigo, com *Azospirillum*, ainda não ocorre devido à inconsistência e à variabilidade dos dados experimentais, e também às características de vida livre destas bactérias. Fatores importantes para a avaliação das respostas desta inoculação incluem a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de associação com as raízes, além da identificação das condições do solo e do ambiente que interferem neste fenômeno.

Em geral, a grande maioria dos estudos relacionados à prática de inoculação de *Azospirillum*, tanto em cereais como em outras gramíneas, em vários países do mundo, mostra respostas positivas em termos de acúmulo de matéria seca e/ou de nitrogênio nas plantas (BODDEY *et al.*, 1986; OKON & KAPULNIK, 1986; MICHIELS *et al.*, 1989).

À medida que *Azospirillum* coloniza as raízes, ocorre uma promoção da ramificação de raízes (JAIN & PATRIQUIN, 1985; ZIMMER *et al.*, 1988; BOTHE *et al.*, 1992), um aumento da absorção de nutrientes (LIN *et al.*, 1983; KAPULNIK *et al.*, 1985; PACOVSKY, 1990), vários efeitos sobre as relações hídricas (KAPULNIK *et al.*, 1987), um incremento da fixação de N₂ (CHALK, 1991) e, em muitos casos, um aumento da produtividade de cereais, pastagens (BODDEY *et al.*, 1986; KAPULNIK *et al.*, 1987; BODDEY & VICTÓRIA, 1986) e leguminosas (SARIG *et al.*, 1985). A maioria destes efeitos são creditados à produção de substâncias de crescimento pelo *Azospirillum* (TIEN *et al.*, 1979; JAIN & PATRIQUIN, 1985; BOTHE *et al.*, 1992), uma vez que a contribuição da fixação biológica do nitrogênio parece ser de menor importância (BODDEY *et al.*, 1986; BASHAN *et al.*, 1989a).

Não está suficientemente esclarecido, porém, o modo pelo qual os hormônios produzidos pela bactéria afetam as respostas descritas anteriormente. Vários autores propõem que estes efeitos seriam provocados pela ação do ácido indolil-3-acético (IAA), uma vez que *Azospirillum* produz IAA "in vitro" (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980; PATRIQUIN *et al.*, 1983; ZIMMER & BOTHE, 1988). Mais recentemente ZIMMER *et al.* (1988) e BOTHE *et al.* (1992), levantaram a hipótese que nitrito, em

associação com ascorbato, afeta o crescimento e a ramificação das raízes do trigo, de maneira semelhante à auxina. O nitrito seria produzido pela bactéria, quando da utilização de nitrato como substrato para a respiração em ambiente com baixa pressão parcial de oxigênio (NEYRA & DOBEREINER, 1979; NEUER *et al.*, 1985). BOTHE *et al.* (1992) sugeriram que o nitrito causaria o aumento da ramificação de raízes de plântulas de trigo de maneira semelhante ao efeito provocado pela inoculação, parâmetro este não observado quando da aplicação exógena de IAA. Assim, da mesma maneira que a bactéria produziria IAA quando em associação com o sistema radicular, também poderia produzir e excretar nitrito, uma vez que tanto *Azospirillum brasilense* como *Azospirillum lipoferum*, possuem característica denitrificante (NEYRA e DOBEREINER, 1979). A quantidade de oxigênio normalmente presente no ambiente das raízes crescendo no solo, pode não ser suficiente para a produção, pela bactéria, de quantidade de IAA, necessária para o pleno crescimento do sistema radicular (ZIMMER *et al.*, 1988), condição esta, no entanto, que favoreceria a produção de nitrito, na presença de nitrato, e a expressão de seus efeitos sobre o crescimento celular.

A preferência relativa para a colonização de raízes de uma planta por *Azospirillum* isolado da mesma espécie, portanto homólogo, sugere a existência de especificidade na interação (BALDANI *et al.*, 1986; PINHEIRO, 1992). A presença de raízes de uma determinada espécie exerce, provavelmente, uma atração de natureza química (quimiotaxia) para uma dada estirpe de *Azospirillum*, influência esta, possivelmente originada dos exudatos das raízes (REINHOLD *et al.*, 1985). O comportamento aerotático exibido pelo *Azospirillum* indica que esta bactéria se move para locais onde a concentração de oxigênio é adequada para seu crescimento (REINER & OKON, 1986). Dessa forma, bactérias do gênero *Azospirillum* isoladas de raízes de trigo, poderiam colonizar preferencialmente raízes desta mesma espécie (BALDANI *et al.*, 1986), em comparação com estirpes isoladas de outras plantas (PINHEIRO, 1992). Além disso, as condições de anaerobiose parcial que ocorre no interior da raiz, que seriam desfavoráveis para a síntese de IAA, mas não para a produção de nitrito, provocariam, também, a colonização mais eficiente nos locais da raiz ricos em esqueletos de carbono e com condições adequadas para a expressão da atividade da nitrogenase.

Em levantamento efetuado em lavouras de trigo da região da EMBRAPA-CNPTrigo-Passo Fundo, RS, na tentativa de encontrar bactérias do gênero *Azospirillum* adaptadas às condições ambientais da região, que naturalmente estavam colonizando raízes de trigo, foi observado que algumas destas bactérias promoveram maior crescimento radicular em plântulas de trigo, quando comparadas com a estirpe 245, isolada também de trigo, porém, de outra região (DIDONET, A.D. & KENNER, M.H., dados não publicados). Dentre as estirpes coletadas foram selecionadas duas para estudos posteriores, a saber: JA03-*Azospirillum lipoferum* e JA04-*Azospirillum brasilense*.

O presente trabalho teve por objetivo estudar alguns processos bioquímico/fisiológicos associados ao fenômeno de interação *Azospirillum*-trigo, que induzem o aumento do crescimento do sistema radicular das plantas. O esclarecimento de tais mecanismos pode significar o estabelecimento de práticas que resultem no melhor aproveitamento de nutrientes e água pelas plantas, com economia de insumos sem perda de produtividade.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bactérias do gênero *Azospirillum* são, provavelmente as mais estudadas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR), que se associam não-simbionticamente ao sistema radicular das plantas, principalmente cereais e gramíneas (BASHAN & LEVANONY, 1990 e PENOT *et al.*, 1992). Estas bactérias tem sido encontradas nas raízes de várias espécies de regiões tropicais, temperadas e frias, nos mais diversos tipos de solos (MICHIELS *et al.*, 1989). As bactérias são encontradas na superfície das raízes, nos espaços intercelulares, na superfície dos pelos absorventes e, principalmente, na zona de alongamento radicular, em plântulas cujas sementes ou raízes foram inoculadas (PATRIQUIN & DOBEREINER, 1978; UMALI-GARCIA *et al.*, 1980; PATRIQUIN *et al.*, 1983; BASHAN *et al.*, 1986; OKON & KAPULNIK, 1986; LEVANONY *et al.*, 1989 e BASHAN *et al.*, 1990).

Os efeitos da inoculação com *Azospirillum* em diferentes cereais são bastante diversos, e os mecanismos envolvidos na interação bactéria/planta são ainda bastante especulativos. Vários estudos sugerem o envolvimento da fixação biológica do nitrogênio, efeitos hormonais, incremento no desenvolvimento radicular e conseqüente maior absorção de água e nutrientes, além do estímulo à assimilação do nitrato (BARBER *et al.*, 1976; TIEN *et al.*, 1979; BERG *et al.*, 1980; HAAHTELA *et al.*, 1981; LIN *et al.*, 1983; MERTENS & HESS, 1984; BASHAN, 1986; FERREIRA *et al.*, 1987; KUCEY, 1988; ZIMMER *et al.*, 1988; ZIMMER & BOTHE, 1988; ARSAC *et al.*, 1990; BASHAN *et al.*, 1990; CHALK, 1991; BOTHE *et al.*, 1992.)

A contribuição da fixação do N₂ atmosférico por *Azospirillum*, na promoção do desenvolvimento da planta, parece ser pouco significativa (BODDEY *et al.*, 1986; BASHAN *et al.*, 1989a; BASHAN *et al.*, 1990), embora estas bactérias, comprovadamente, sejam capazes de fixar o N₂ atmosférico em meio de cultura (NEYRA & DOBEREINER, 1979; DOBEREINER, 1980). Da mesma forma, o efeito do *Azospirillum* na promoção da absorção de nutrientes não parece constituir um mecanismo geral de resposta, embora ocorra (BASHAN *et al.*, 1990). O envolvimento de hormônios nas respostas à inoculação tem tido maior aceitação, embora as evidências ainda sejam bastante circunstanciais (OKON & KAPULNIK, 1986; ZIMMER & BOTHE, 1988; BASHAN *et al.*, 1989; STANCHEVA *et al.*, 1992;). É possível que os efeitos benéficos atribuídos à inoculação da planta com *Azospirillum* resultem de uma combinação de diferentes mecanismos que, em

conjunto, desencadeariam os vários fenômenos.

Segundo PATRIQUIN *et al.*, (1983), o aumento do número de microorganismos diazotróficos na rizosfera pode ser atribuído à competitividade em relação à esqueletos de carbono, ao ambiente pobre em nitrogênio e à atração aerotática do *Azospirillum* para regiões da raiz com reduzida pressão de oxigênio. Considerando o conjunto dos metabólitos, a quimiotaxia do *Azospirillum* parece estar associada aos ácidos orgânicos (REINHOLD *et al.*, 1985; HEINRICH & HESS, 1985 e REINHOLD *et al.*, 1989). *Azospirillum brasilense* isolado de raízes de trigo foi, segundo aqueles autores, mais fortemente atraído por ácido oxálico, que é o principal ácido orgânico exudado por raízes de trigo (VANCURA, 1964). Plantas de trigo que são mais tolerantes ao alumínio, por secretarem maior quantidade de ácido succínico, málico e oxálico, também parecem favorecer a associação com *Azospirillum* (CHRISTIANSEN-WENIGER *et al.*, 1992). Atração quimiostática também foi demonstrada por BARAK *et al.* (1983), em condições onde a influência do oxigênio foi descartada.

A exudação de substâncias pelas raízes e, ao mesmo tempo, a absorção de água e nutrientes, criam um gradiente químico em direção à raiz que, aparentemente, é detectado pelo *Azospirillum* (OKON & KAPULNIK, 1986). Estes fatos poderiam explicar uma certa preferência da bactéria pela zona de alongamento da raiz (BASHAN & LEVANONY, 1989a), pois esta região se mantém em intensa atividade metabólica.

A exploração de horizontes inferiores do solo pelas raízes de trigo, faz com que o *Azospirillum brasilense* Cd, seja encontrado em profundidades maiores no perfil do solo (BASHAN & LEVANONY, 1987). Esta atração é exercida pela raiz, mas também depende da capacidade da bactéria de formar aglomerados, possivelmente através de filamentos de natureza proteica (BASHAN *et al.*, 1986; BASHAN & LEVANONY, 1988; BASHAN & LEVANONY, 1988a; BASHAN *et al.*, 1991). Foi verificado, também, que o tratamento dos pelos radiculares com celulase provocou um aumento da adsorção do *Azospirillum* às raízes (BASHAN & LEVANONY, 1989a), sugerindo que a atividade pectinolítica destas bactérias também está envolvida no processo (TIEN *et al.*, 1981).

Os agregados formados, tanto entre as bactérias isoladas, ou em contato com as raízes de trigo, milho e milheto (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980; PATRIQUIN *et al.*, 1983), parecem estar relacionados com a capacidade de floculação das bactérias em meio de cultura (SADASIVAN & NEYRA, 1985 e SADASIVAN & NEYRA, 1987).

A adição de celulase às bactérias floculadas, provocou dispersão destes flocos (DEL GALLO *et al.*, 1989), da mesma maneira que o tratamento com celulase em raízes de trigo favorece a adsorção das bactérias às raízes (BASHAN & LEVANONY, 1989a). MICHIELS *et al.*, (1991) observaram duas diferentes etapas na adsorção das bactérias às raízes de trigo: uma adsorção fraca dependente de proteínas da superfície da bactéria, e uma mais forte, dependente dos polissacarídeos extracelulares da bactéria. Estas observações sugerem que os polissacarídeos da cápsula da bactéria estão envolvidos no processo de colonização da raiz por *Azospirillum*, segundo um mecanismo que, possivelmente, envolve lectinas (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980; PATRIQUIN *et al.*, 1983 e ELMERICH, 1984). Evidências "in vitro" do envolvimento de lectinas e da cápsula celular de *Azospirillum* no processo de colonização, foram obtidas por DEL GALLO *et al.* (1989). Estes autores verificaram que diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum*, ligam-se de forma específica à lectina de trigo e não à lectina de soja, sugerindo que a superfície celular da bactéria possui açúcares específicos que reconhecem a aglutinina de trigo (WGA). Microorganismos patogênicos parecem utilizar semelhante mecanismo de reconhecimento do hospedeiro através da aglutinação com lectinas (BRADSHAW-ROUSE *et al.*, 1981; ETZLER, 1985).

O ambiente microaerofílico exigido pelo *Azospirillum* para fixar N₂, é bem estabelecido (TARRAND *et al.*, 1978) devido, basicamente, às exigências de baixo teor de oxigênio para a atividade da nitrogenase. Desta maneira, a localização da bactéria no interior da raiz, e mesmo na rizosfera, poderia proporcionar um ambiente favorável, tanto para fixar N₂ atmosférico, como para a utilização das fontes de carbono (PATRIQUIN *et al.*, 1983). Recentemente, TCHAN *et al.* (1991) mostraram que raízes de trigo tratadas com 2,4-D e *Azospirillum*, produziram estruturas diferenciadas na raiz, criando um ambiente propício para a associação da bactéria com a planta. Além disso, nesta condição de semi-anaerobiose, as bactérias poderiam facilmente promover desnitrificação (NEYRA *et al.*, 1977; NELSON & KNOWLES, 1978; NEYRA & DOBEREINER, 1979), da mesma forma que *Escherichia coli* em meio de cultura (BRONS & ZEHNDER, 1990), havendo nitrato disponível.

A suposição de que estirpes de *Azospirillum*, que predominam tanto em cereais de via fotossintética C-4 como C-3, são do tipo nitrito-redutase negativas, *nir⁻*, isto é, não formam gás a partir de nitrito (PATRIQUIN *et al.*, 1983), indica que as bactérias poderiam acumular nitrito quando em associação com as raízes. Há também evidências que o nitrato inibe fortemente a colonização das raízes por

Azospirillum (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980). ZIMMER *et al.* (1988) sugerem que tal fenômeno poderia ocorrer devido a quantidades tóxicas de nitrito produzido pela respiração do nitrato pela bactéria. BASHAN & LEVANONY (1989a) mostraram que condições microaerofílicas favorecem a adsorção do *Azospirillum* às raízes de trigo, e que esta adsorção é extremamente dependente da atividade metabólica das bactérias, e também do número de bactérias presentes no inóculo (BASHAN, 1986 e BASHAN, 1986a). Assim, bactérias metabolicamente ativas seriam necessárias para produzir nitrito, e o número de bactérias poderia estar relacionado com a maior ou menor produção de nitrito na raiz colonizada. Os resultados mostrando que a estirpe 245 de *Azospirillum*, sem atividade de redutase de nitrato, produziu menor efeito no aumento do peso da matéria seca de trigo do que a estirpe 245 original, ou seja, com atividade de redutase de nitrato (FERREIRA *et al.*, 1987), também indicam um possível papel do nitrito na resposta do trigo à inoculação.

A grande maioria das respostas associadas à inoculação com *Azospirillum*, principalmente as que envolvem o sistema radicular, parece ocorrer através de um mecanismo do tipo hormonal (OKON & KAPULNIK, 1986; ZIMMER & BOTHE, 1988). Sendo assim, os fitormônios seriam, teoricamente, as substâncias capazes de desencadear estes efeitos (TIEN *et al.*, 1979), cujo resultado final é o crescimento da planta. Em meio de cultura, *Azospirillum* produz IAA, em quantidade suficiente para atuar sobre o crescimento (TIEN *et al.*, 1979; ZIMMER & BOTHE, 1988; CROZIER *et al.*, 1988), aparentemente na dependência da presença de triptofano. BOTHE *et al.* (1992) observaram que IAA aplicado exogenamente ao sistema radicular de plântulas de trigo não produziu nenhum efeito na formação de raízes laterais, uma das principais respostas da inoculação de trigo com *Azospirillum* (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980; JAIN & PATRIQUIN, 1985). ZIMMER *et al.* (1988) e BOTHE *et al.* (1992) demonstraram que nitrito exógeno, ou proveniente da respiração da bactéria na presença de nitrato, provocou um incremento do volume radicular, um tipo de resposta semelhante ao mecanismo de ação hormonal. Segundo aqueles autores, o nitrito estaria atuando em concentrações hormonais, envolvendo ascorbato, de forma diferente do mecanismo de ação da auxina. Nitrito, por outro lado, pode se acumular no meio de crescimento de *Azospirillum* contendo nitrato, em quantidades que podem atingir de 3 mM a 6 mM, como resultado da respiração em condições de semi-anaerobiose (NEYRA & DOBEREINER, 1979; NEUER *et al.*, 1985; ZIMMER *et al.*, 1988).

Ao que tudo indica, as respostas da inoculação de trigo com *Azospirillum* podem ser, em grande parte, creditadas a fitormônios, e dentre estes, a auxina assume maior importância. Para que ocorra expansão da célula vegetal é necessário, em primeiro lugar, que a parede torne-se menos rígida, para propiciar sua extensão à medida que a célula absorve água. Simultaneamente com o aumento do volume celular é necessário que haja deposição de material de parede celular, fazendo com que o processo de alongamento ocorra de maneira irreversível. A ação da auxina neste processo, apesar de reconhecida a bastante tempo, não é completamente explicada a nível bioquímico (MASUDA, 1978; BRUMMELL & HALL, 1987; MASUDA, 1990; RAYLE & CLELAND, 1992). Um possível mecanismo de ação da auxina na promoção do crescimento celular é sumarizado na FIGURA 1.

Ampla evidência experimental indica que a extensibilidade da parede celular ocorre em ambiente ácido, e que auxina promove esta acidificação (RAYLE & CLELAND, 1992). Os resultados mostram que o efluxo de prótons para a parede celular, induzido por auxina, é mediado por uma H⁺-ATPase da membrana plasmática (SANTONI *et al.*, 1990; HAGER *et al.*, 1991), embora os aspectos moleculares da ação da H⁺-ATPase não estejam completamente esclarecidos. Varias evidências indicam que o estímulo ao efluxo de prótons mediado por auxina, é modulado por íons cálcio (ELLIOT *et al.*, 1983; RAGHOTHAMA *et al.*, 1985; GONZÁLES-DARÓS *et al.*, 1993).

Sabe-se que a auxina endógena, ou a aplicação exógena de IAA, provocam a abertura de canais de cálcio na plasmalema (OLBE & SOMMARIN, 1991; JOHANNES *et al.*, 1991), resultando em perturbações da homeostase de cálcio no citossol (RENGEL, 1992), que deve ser mantida ao redor de 100 nM (BRUMMELL & HALL, 1987; OLBE & SOMMARIN, 1991; JOHANNES *et al.*, 1991; DROBAK, 1992). Nas células vegetais, à medida que Ca²⁺ é liberado no citoplasma, sua concentração é controlada por processos de influxo/efluxo envolvendo compartimentos celulares, principalmente o vacúolo e o retículo endoplasmático (MACKLON, 1984), e pelo funcionamento de sistemas de co-transporte Ca²⁺/H⁺ nas membranas (SCHUMAKER & SZE, 1985). A diminuição do pH citoplasmático causada pelo efluxo de prótons do vacúolo, provoca acidificação do citossol, e ativa a H⁺-ATPase sensível a ortovanadato (COCUCCI *et al.*, 1980; CHURCHILL & SZE, 1983). A acidificação do apoplasto associada à extrusão de prótons seria responsável pelo relaxamento da estrutura da parede celular (CLELAND, 1986; FELLE, 1988; RAYLE & CLELAND, 1992), possivelmente pela ativação de enzimas que atuam sobre os materiais

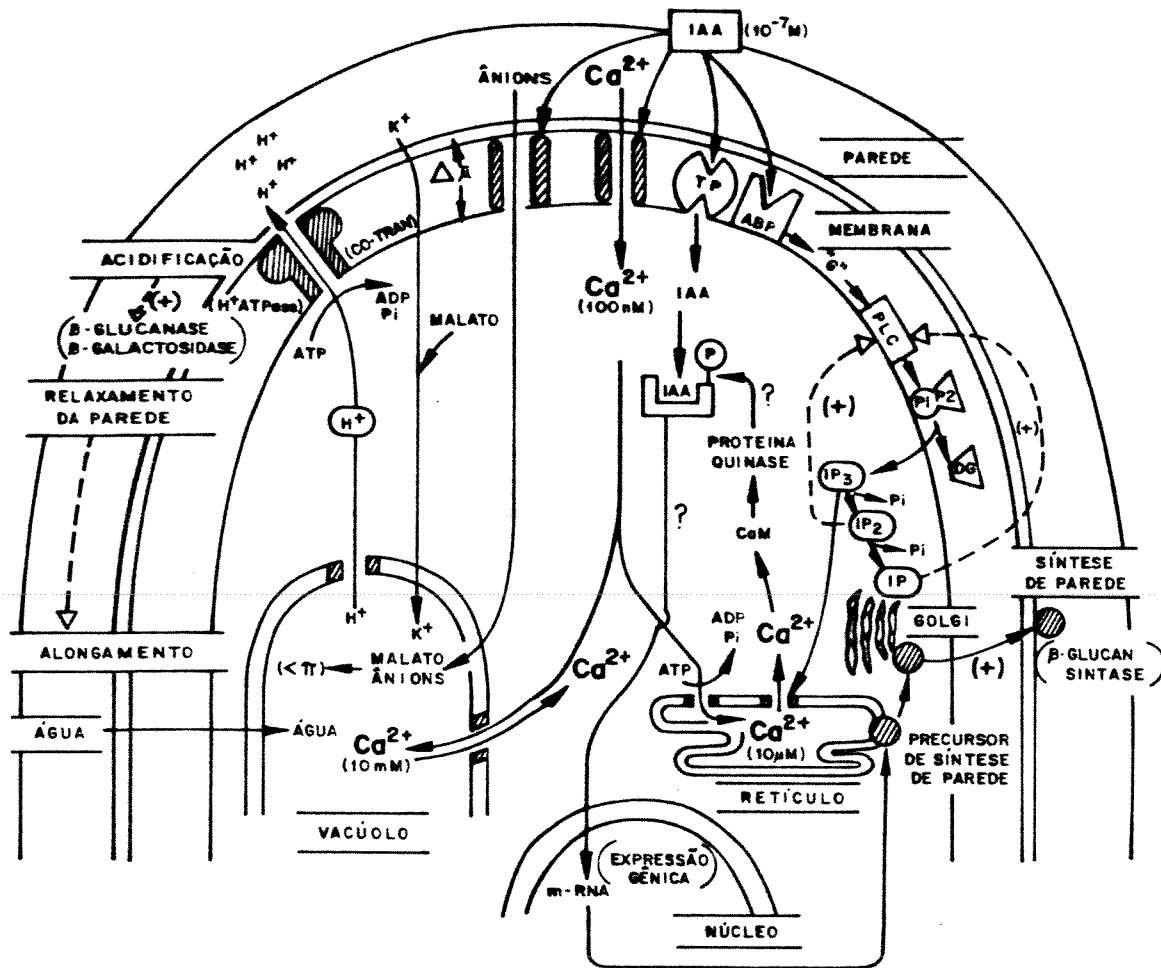


Figura 1 - Proposta de um mecanismo geral de ação do Ácido Indolil-3-Acético (IAA) no crescimento de tecidos em alongamento. Estão indicados os mensageiros secundários intracelulares (Ca^{2+} e PLC). Modelo baseado em dados obtidos por diferentes autores. Legenda: PLC - fosfolipase C; IP_3 , IP_2 , IP - fosfoinosítidos; CaM - calcio-calmodulina; TP - proteína transportadora; ABP - proteína de ligação do IAA; "G" - proteína transdutora de sinal; PIP_2 - fosfatidil inositol bis-fosfato; DG - diacil glicerol; $\Delta\mu$ - gradiente de potencial trans-membrana; Π - potencial osmótico; CO-TRAN - co-transporte na membrana.

extracelulares (NAGAHASHI *et al.*, 1990; MCQUEEN-MASON *et al.*, 1992; AUGUR *et al.*, 1992; HOSON *et al.*, 1992), facilitando assim a atuação da pressão de turgescência (MASUDA, 1978; MASUDA, 1990).

O crescimento celular devido à auxina envolve, necessariamente, a síntese de material de parede celular. Para tanto, a ação da auxina seria a de desencadear uma série de eventos levando à síntese "de novo" de RNA mensageiro associado à produção e/ou ativação de substâncias envolvidas na síntese de componentes da parede celular. Na verdade, a percepção do sinal da auxina é iniciada pelo seu reconhecimento por receptores específicos, "auxin-binding proteins", localizados nas membranas celulares ou no citoplasma (BRUMMELL & HALL, 1987; VENIS & NAPIER, 1991; JONES & PRASAD, 1992; DARGINAVICIENE *et al.*, 1992; JONES & HERMAN, 1993). Na membrana plasmática, a formação do complexo IAA/receptor desencadearia várias reações em cascata, envolvendo as enzimas "G", e fosfolipase C, moduladoras das reações ligadas ao metabolismo dos fosfoinosítídeos (MELIN *et al.*, 1987; ANDRÉ & SCHERER, 1991; DROBAK, 1992; MELIN *et al.*, 1992). Dentre os vários fosfoinosítídeos identificados em plantas, IP_3 e IP_2 podem induzir a abertura de canais para a liberação de cálcio dos compartimentos celulares, particularmente do retículo endoplasmático e do vacúolo, para o citossol (JOHANNES *et al.*, 1991; DROBAK, 1992). O evento seguinte seria a ligação do cálcio com calmodulina, formando o complexo Ca-calmodulina (ELLIOT *et al.*, 1983; RAGHOTHAMA *et al.*, 1985; GONZÁLES-DARÓS *et al.*, 1993), que atua na promoção das reações de fosforilação mediadas por proteínas quinase (BRUMMELL & HALL, 1987). A eventual formação de um complexo IAA-proteína fosforilada, causaria uma derrepressão gênica específica para a síntese de RNAs mensageiros precursores de enzimas que atuam na síntese de constituintes da parede celular (THEOLOGIS, 1986; BACHS *et al.*, 1992), num processo envolvendo o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi (HAGER *et al.*, 1991; RAYLE & CLELAND, 1992).

O aumento no teor de cálcio livre no citoplasma, provocado pela ação da auxina, promoveria a acidificação do citoplasma e um influxo de íons K^+ , além de outras substâncias osmoticamente ativas em co-transporte ("antiporter") com H^+ . Como resultado, ocorreria diminuição do potencial osmótico das células e a entrada de água, resultando na expansão celular. A sustentação do crescimento subsequente dependeria da síntese de material constituinte da parede celular.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Origem das bactérias.

As bactérias do gênero *Azospirillum* utilizadas foram as seguintes:

a) Estirpe 245. *Azospirillum brasilense*, resistente a 20 µg/ml de espectinomicina, isolada de raízes estéreis de trigo. A esterilização das raízes foi feita com solução 1% de Cloramina T, por 5 minutos.

b) Estirpe JA04. *Azospirillum brasilense*, isolada de raízes lavadas de trigo crescido em solo pobre de nitrogênio, no município de Passo Fundo, RS (A. D. DIDONET & J. MANDEL).

c) Estirpe JA03. *Azospirillum lipoferum*, isolada de raízes lavadas de trigo, crescido em solo pobre de nitrogênio, no município de Passo Fundo, RS (A. D. DIDONET & J. MANDEL).

2 - Crescimento das bactérias.

2.1 - Crescimento em meio líquido.

O inóculo foi sempre obtido a partir de colônias isoladas das bactérias crescidas em placa de petri contendo meio "batata" (ver Apêndice). Duas a três colônias foram alçadas e colocadas para crescer em meio NFb contendo NH_4Cl ou KNO_3 , em temperatura de 30°C com agitação de 60, 100, 150 e 200 rpm durante 16 a 18 horas. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas, lavadas por três vezes com água estéril e ressuspensas até a concentração desejada de bactérias. A quantidade de meio de crescimento foi de 50 ou 100 ml, em erlemeyer de 125 ou 250 ml, vedado com tampão de algodão.

2.2 - Crescimento em meio NFb semi-sólido.

Em vidros de penicilina de 10 ml de capacidade, foram colodados 5 ml de meio NFb semi-sólido (Apêndice), vedados com tampão de algodão e após autoclavados, foram inoculados com uma colônia de bactérias da estirpe desejada. Todos os testes em meio semi-sólido foram feitos da forma descrita acima, sendo que as repicagens para manutenção das culturas foram efetuadas a cada 48 horas.

2.3 - Contagem do número de células.

A contagem do número de células foi feita pela correlação entre densidade ótica (660 nm) e o número de colônias formadas em placa de petri contendo meio batata. Cada placa recebeu 10µl da suspensão de bactérias diluídas convenientemente, em três repetições, onde se determinou o número de colônias formadas após o crescimento. O número de células foi expresso por ml de meio de crescimento.

2.4 - Meio de crescimento para determinação de IAA (ácido indolil-3-acético).

Ao meio NFb líquido acrescido de 1 g/l de NH₄Cl, previamente autoclavado e à temperatura ambiente, foi adicionado o equivalente a 100 mg/l de triptofano, esterilizado em filtro milipore no momento da inoculação. Em um segundo tratamento, omitiu-se o triptofano.

2.5 - Teste para *nir* (nitrito redutase) (DOBEREINER, 1980).

O meio NFb semi-sólido foi suplementado com 5 mM de NH₄NO₃. A presença de bolhas de ar após o crescimento a 30°C e posterior agitação vigorosa do meio, caracteriza a bactéria como *nir*⁺, ou seja, denitrificante.

2.6 - Teste para crescimento com glicose.

Ao meio NFb semi-sólido sem nitrogênio foram adicionados 5g/l de glicose, em substituição ao ácido málico, a qual foi acrescentada após esterilização em filtro milipore ao meio NFb em banho-maria. A formação de película característica após 48 horas de incubação a 30°C, é indicativo de estirpe de *Azospirillum lipoferum*. *Azospirillum brasilense* não forma película na presença de glicose como fonte de carbono.

3 - Determinação do teor de oxigênio dissolvido no meio.

Para a determinação da quantidade de oxigênio dissolvido no meio de crescimento no instante da inoculação com a bactéria, utilizou-se o eletrodo polarográfico de oxigênio, modelo ICM 31100. Antes da leitura o meio de incubação foi equilibrado, durante uma hora, nas condições de temperatura e agitação desejadas (30°C e rotações de 60, 100, 150 e 200 rpm, ou o borbulhamento de N₂ durante 5 minutos).

4 - Determinação de nitrito.

Após centrifugação para retirada das bactérias do meio de crescimento, alíquotas adequadas do sobrenadante foram utilizadas para determinação de nitrito, segundo o método proposto por NICHOLAS & NASON (1957), utilizando-se NaNO₂ como padrão. A reação foi provocada com N-2-naftil-etileno-diamina-HCl 0.02% e sulfanilamida 1% em HCl 1.5 N, e a absorbância determinada a 540 nm. Os resultados foram expressos em µg de NO₂/ml de meio de cultura.

5 - Determinação de IAA.

Para determinação do conteúdo de IAA, as bactérias foram crescidas em 100 ml de meio NFb contendo NH₄Cl, com ou sem o equivalente a 100 mg/l de triptofano por 24 horas, a 30°C, com agitação de 150 rpm. Após determinação da A 660 nm, o meio foi centrifugado a 27000 g a 4°C. Coletou-se o sobrenadante e o pH foi ajustado a 8.0. Em seguida adicionou-se 2 x 10⁵ dpm de [2'-¹⁴C]IAA como padrão interno. Após acrescentar 0.85 mg/ml de dietil-ditiocarbamato de sódio; 3 medidas de polivinilpirrolidona e filtrar, o pH foi corrigido para 3.0 com H₂SO₄. Em seguida promoveu-se a partição por três vezes a 1/3 do volume com dietil éter, combinando-se ao final as três frações éter. Adicionou-se em seguida sulfato de sódio anidro em excesso, deixado em repouso por 10 minutos, filtrado e secado em evaporador rotativo a vácuo e ressuspensão em volume conhecido de metanol.

A determinação da concentração de IAA foi feita em HPLC, no Departamento de Botânica da Universidade de Glasgow, segundo metodologia descrita por CROZIER

et al. (1988).

6 - Crescimento das plântulas.

Após esterilização, (item 8.1) as sementes foram colocadas para germinar em cartuchos de papel de germinação previamente umedecidos e esterilizados, durante 3 a 6 dias, no escuro a 30°C, em câmara de incubação. Após a seleção, as plântulas foram divididas em lotes de 8 a 10 e colocadas por 24 horas em frascos envoltos em papel alumínio, contendo solução nutritiva descrita por MARSCHNER et al. (1982), a 28°C, com iluminação moderada, em câmara de crescimento. Em seguida, a solução nutritiva foi renovada, quando então se coletaram amostras para determinação do efluxo de prótons ou medição do pH. Ao final, as raízes foram destacadas, procedidas as medições e contagens e o excesso de água retirado em papel absorvente para a determinação do peso da matéria fresca. Nos experimentos que incluíram inoculação, as sementes foram sempre tratadas, por imersão, com uma suspensão de bactérias em água (em torno de 10^5 células/ml) da estirpe correspondente, durante uma hora, sob agitação, e em seguida colocadas para germinar. Nos experimentos de inoculação sempre se utilizou um tratamento controle, com as sementes imersas em água estéril, na mesma temperatura e agitação.

6.1 - Solução nutritiva de MARSCHNER et al. (1982).

Concentração dos sais, em mM: K_2SO_4 , 0.75; $MgSO_4$, 0.65; KH_2PO_4 , 0.1; $(NH_4)_2SO_4$, 0.5; $CaSO_4$, 0.5; H_3BO_4 , 1.0×10^{-2} ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1.0×10^{-4} ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5×10^{-5} ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5×10^{-5} ; $H_2MoO_4 \cdot H_2O$, 0.5×10^{-6} . O pH foi ajustado para 6.0. Na solução contendo nitrato, 0.5 mM de $(NH_4)_2SO_4$ e 0.5 mM de $CaSO_4$ foram substituídos por 2 mM de $Ca(NO_3)_2$. Quando da adição de IAA nitrito e orto-vanadato, nas concentrações desejadas, o pH foi sempre corrigido para 6.0.

Para avaliação do efluxo de prótons, à solução acima, foram adicionados 0.5% de agar e 0.005% de bromocresol púrpura (MARSCHNER et al., 1982; MARSCHNER & ROMHELD, 1983 e ROMHELD et al., 1984). Esta solução, após dissolvido o agar, foi colocada em placas de petri e mantida a 40°C. As raízes das plântulas de trigo foram colocadas na solução e, após solidificação do agar, foi

observada a mudança de cor do meio de vermelho para amarelo, que ocorreu devido à acidificação promovida pelas raízes.

7 - Obtenção do sobrenadante das bactérias para teste com os segmentos de raiz de trigo.

Após o crescimento das bactérias nas condições desejadas para o teste, o meio foi centrifugado a 27000 g, em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado e filtrado em millipore, seguindo-se a determinação do teor de nitrato e procedida uma série de diluições pelo fator 10. Quando as bactérias foram crescidas em meio contendo NH_4Cl , não foi determinado o teor de nitrato.

8 - Origem das sementes de trigo.

As sementes de trigo usadas foram das variedades IAC-5, fornecida pelo Instituto Agrônomo de Campinas; BR-23, BR-32 e BR-35, fornecidas pelo CNPTrigo da EMBRAPA- Passo Fundo, RS.

8.1 - Esterilização das sementes.

Após selecionadas visando a maior uniformidade possível, as sementes foram imersas em etanol 70%, durante 10 minutos sob agitação. Após lavagem em água estéril foi adicionado água sanitária comercial diluída a 50%, acrescida de HCl 0.005 N, durante 10 minutos, quando então procedeu-se de 6 a 8 lavagens com água estéril, ou até se obter a eliminação total do hipoclorito de sódio e do HCl.

9 - Determinação do peso da matéria fresca, comprimento e número de raízes.

Após o crescimento das plântulas, foram realizadas as avaliações do comprimento radicular (maior raiz) e do número de raízes maiores que 1 cm de

cada plântula, utilizando, no mínimo 100 plântulas para cada tratamento, divididas em lotes de 25 plântulas. As raízes foram destacadas, removido o excesso de água com papel absorvente, e determinado o peso da matéria fresca.

10 - Avaliação do peso da matéria fresca de segmentos de raiz de trigo.

O teste foi efetuado conforme metodologia descrita por ZIMMER *et al.* (1988), e originalmente utilizado como um ensaio para auxina em raízes de trigo. O material foi obtido de doze segmentos uniformes de 0,5cm, destacados da zona de alongamento da raiz, descartando-se 2 mm da ponta da raiz. Os segmentos foram colocados em placa de petri (36 segmentos por placa), contendo papel de filtro umedecido com 2.5 ml da solução teste. Em seguida as raízes foram incubadas a 28°C, no escuro, por um período de até 48 horas. O peso da matéria fresca dos segmentos foi determinado nos intervalos de tempo necessários, em balança de precisão, após retirado o excesso de solução. O resultado foi expresso em percentagem de aumento de peso de matéria fresca em relação ao tratamento controle (solução teste somente com água), tendo como base o peso da matéria fresca dos segmentos de raiz no tempo zero. O cálculo foi efetuado da seguinte forma:

% de aumento de peso da matéria fresca = $(D-C)-(B-A)/C \times 100$, onde:

A - média do peso da matéria fresca do controle no tempo zero,

B - idem, no tempo t,

C - média do peso da matéria fresca do tratamento no tempo zero,

D - idem, no tempo t.

11 - Determinação do efluxo de prótons.

A quantidade de prótons liberada por raízes de plântulas intactas de trigo de 4 a 6 dias após a germinação, foi determinada pela titulação da solução nutritiva até o pH original, com NaOH 0.001 N. As avaliações foram feitas após incubação das raízes por 6 a 8 horas. Para maior praticidade, foi utilizado azul de bromotimol

0.001% padronizando-se a viragem em pH 7.0. Alternativamente, a medida do pH da solução foi correlacionada com a concentração de H^+ liberada na solução. O efluxo de prótons também foi determinado correlacionando-se o pH, numa faixa de 4.5 a 6.5, com a absorbância a 588 nm da solução contendo bromocresol púrpura 0.005% (FIGURA 2). IAA e nitrito foram adicionados numa concentração final de $10^{-7}M$, e orto-vanadato na concentração de $200 \mu M$. Esta concentração de orto-vanadato foi determinada como sendo suficiente para inibir o efluxo de prótons em raízes intactas de plântulas de trigo (BASHAN *et al.*, 1989). Para cada tratamento, foi sempre incluído um branco, para eliminar as variações não inerentes aos tratamentos estudados.

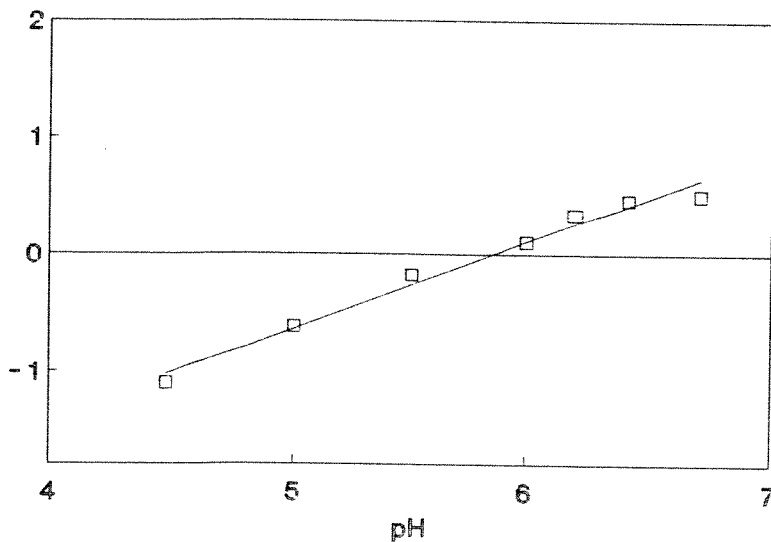


Figura 2 - Correlação entre o pH e absorbância (588nm) do meio de crescimento das raízes. Solução nutritiva de MARSHCNER *et al* (1982), com adição de corante bromocresol púrpura 0,005%.

12 - Tratamentos com drogas farmacológicas.

As soluções testadas, diluídas em água estéril foram: IAA (ácido indol acético); nitrito ($NaNO_2$) em concentrações na faixa de 10^{-4} até $10^{-12}M$; TFP (trifluorperazina), um antagonista da Ca -calmodulina (RAGHOTHAMA *et al.*, 1985), e Procaína, substância despolarizante de membranas (BRUMMER *et al.*, 1985),

ambos na concentração de 20 μ M. Lítio, um bloqueador da fosforilação de fosfoinosítídeos (MARTINOIA *et al.*, 1993), foi utilizado na concentração de 20mM. Os reagentes bloqueadores de grupamentos SH de proteínas (IWAARDEN *et al.*, 1992; SMITH & VERPOORTE, 1970; LUKACOVIC *et al.*, 1984; ABBOTT & SCHACTER, 1976; PRATZ *et al.*, 1986; BATT *et al.*, 1976), N-etilmaleimida (NEM); Iodoacetamida (Iaa); diamida e p-hidroximercuribenzoato (p-HMB), foram testados na concentração de 0.1 mM para NEM, Iaa e diamida, e de 50 μ M para p-HMB. Nestas concentrações, tanto os reagentes SH como TFP e Procaina adicionados isoladamente, não afetaram o peso da matéria fresca dos segmentos radiculares, num período de tempo de até 48 horas, em relação ao controle. Concentrações superiores às indicadas acima provocaram efeito Inibitório no crescimento dos segmentos de raiz de trigo.

IV - RESULTADOS

1. Fisiologia e crescimento do *Azospirillum*

A formação de película em meio NFb semi-sólido, com 5mM de glicose em substituição ao ácido málico como fonte de carbono, só ocorreu no isolado J03, indicando ser este *Azospirillum lipoferum*. A estirpe 245 e o isolado JA04, que não apresentaram crescimento em meio contendo somente glicose, representam as bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* (DOBEREINER, 1980). A estirpe 245, perfeitamente caracterizada como sendo *Azospirillum brasilense*, foi utilizada como referência. Da mesma forma, o aparecimento de bolhas de ar em meio NFb semi-sólido contendo NH_4NO_3 , também caracterizou o isolado JA03 como sendo nir⁺, o isolado JA04 como nir⁻ e, como esperado, a estirpe 245 também como nir⁻.

A determinação do conteúdo de ácido indolil-3-acético (IAA) no sobrenadante das bactérias crescidas em meio NFb e NH_4Cl , na presença e na ausência de triptofano, revelou que a estirpe JA03 produziu aproximadamente 100% mais IAA, comparativamente a 245 e JA04 (TABELA 1). O resultado das determinações mostrou que a

TABELA 1 - Produção de IAA pelas bactérias em meio de cultura. (*)

Estirpe de <i>Azospirillum</i>	Triptofano (100 mg/l)	Ácido Indolil-3-acético (ng/ml)
245	+	302,0
	-	2,9
JA04	+	327,6
	-	8,1
JA03	+	674,5
	-	20,5

(*) As bactérias foram crescidas em meio NFb acrescido de 1 g/l de NH_4Cl , durante 24 h, a 30°C e agitação de 200 rpm.

presença de triptofano no meio de crescimento induziu maior produção de IAA.

A avaliação do crescimento das bactérias em diferentes temperaturas, permitiu concluir que, comparativamente, a estirpe JA03 apresenta multiplicação mais intensa em temperatura mais baixa (28°C). A 30°C as três estirpes mostraram o mesmo tipo de comportamento, quando crescidas em meio NFb acrescido de 1g/l de NH₄Cl (FIGURA 3). Em temperaturas mais elevadas, 32 e 37°C, as estirpes JA04 e 245 destacaram-se por apresentar crescimento mais intenso, quando comparadas com a JA03. Aparentemente não houve diferenças no crescimento entre a JA04 e a 245 em todos os tratamentos de temperaturas empregados. Com base nos resultados obtidos, foi adotada a temperatura de 30°C nos experimentos que se seguiram, tendo em vista que nesta temperatura as três estirpes apresentaram o mesmo padrão de crescimento, o que não ocorreu nas demais temperaturas testadas.

A disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio líquido de crescimento, é um fator importante para o crescimento de bactérias do gênero *Azospirillum* (NEYRA & DOBEREINER, 1979). Sendo assim, foram realizados testes para avaliação do crescimento das bactérias sob diferentes concentrações de oxigênio, utilizando-se várias rotações da mesa giratória (TABELA 2). Em meio NFb sem nitrogênio, a estirpe JA03 foi a que apresentou melhor crescimento, tanto em condições de menor quantidade de oxigênio (5.48 ppm), quanto em condições de maior disponibilidade de oxigênio (7.66 ppm), do que as estirpes JA04 e 245 (Dados não mostrados). Em meio NFb acrescido de 2g/l de KNO₃ e/ou 1g/l de NH₄Cl, a estirpe JA03 se destacou das demais, quando incubadas em 5.53 ppm de oxigênio dissolvido. Tanto a estirpe JA04 como a 245, foram bastante afetadas pela baixa disponibilidade de oxigênio no meio, independente da fonte de nitrogênio adicionada. Ambas as estirpes cresceram cerca de 30%, comparadas com o crescimento da estirpe JA03 nesta condição. A queda na absorbância (A 660nm) do meio de crescimento da estirpe JA03, a partir de 18 horas de incubação (FIGURA 4), aparentemente foi devido a ocorrência de floculação, condição comumente observada quando as bactérias são submetidas a condições estressantes (LAMM & NEYRA, 1981; SADASIVAN & NEYRA, 1987). No presente caso (TABELA 2), o estresse foi causado pela baixa disponibilidade de oxigênio no meio de crescimento, em situação de alta população de bactérias.

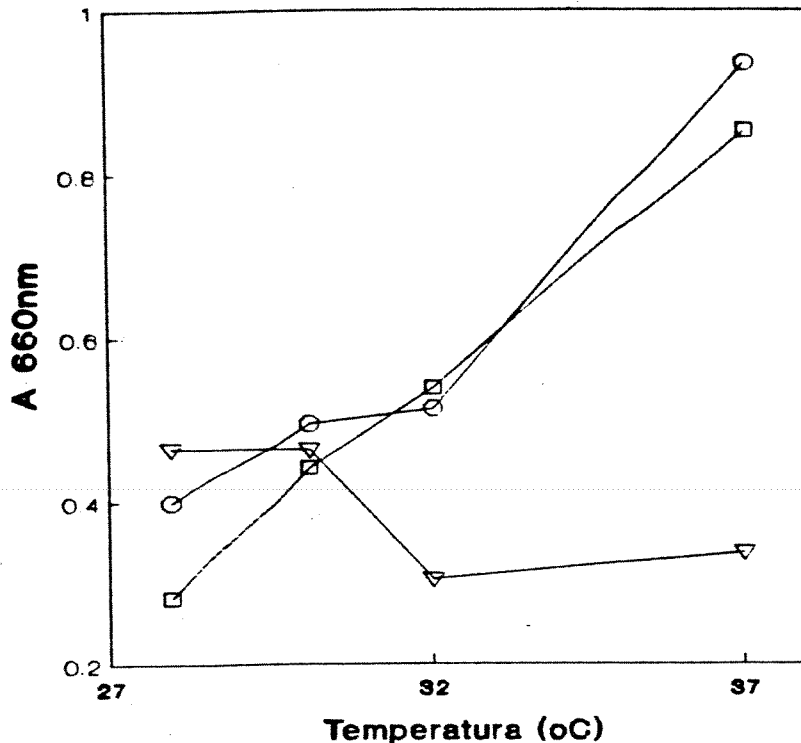


Figura 3 - Efeito da temperatura no crescimento do *Azospirillum*, estirpes 245 (□), JA04 (○) e JA03 (▽). As bactérias foram crescidas por 8 horas em meio NFb líquido com adição de 1g/l de NH₄Cl, com agitação de 200 rpm. Temperatura de 30°C.

Assim como outras bactérias, também aquelas do gênero *Azospirillum* apresentam capacidade de utilizar nitrato para a respiração (BOTHE *et al.*, 1981; NEUER *et al.*, 1985), principalmente sob condições de anaerobiose parcial. O resultado deste processo é a produção de nitrito, que poderá acumular ou ser metabolizado por sucessivas reduções até a geração de N₂. O efeito de diferentes níveis de oxigênio no meio sobre o crescimento e a produção de nitrito pelas bactérias foi investigado, utilizando-se nitrato e amônia como fontes de nitrogênio. Os resultados mostrados na TABELA 3, indicam que a estirpe JA03 acumulou quantidades apreciáveis de nitrito no meio de incubação e apresentou, comparativamente, maior crescimento nas condições experimentais impostas (TABELA 2). Ao contrário, as demais estirpes JA04 e 245,

TABELA 2 - Efeito da concentração de oxigênio dissolvido no meio, sobre o crescimento das bactérias. Os níveis de oxigênio foram obtidos pela utilização de diferentes rotações da mesa giratória.

Oxigênio Dissolvido	Rotação (rpm)	Estirpe de <i>Azospirillum</i>		
		245	JA04	JA03
		Crescimento (A 660 nm)(*)		
5,48 ppm	60 + N ₂	0,102	0,163	0,281
5,53 "	60	0,165	0,140	0,632
6,87 "	100	0,348	0,401	0,466
7,44 "	150	0,594	0,566	0,605
7,66 "	200	0,594	0,475	0,431

(*) As bactérias foram crescidas em 100 ml de meio NFb + 2 g/l de KNO₃, durante 24 h, a 30°C. N₂ - borbulhamento de N₂ no meio, antes da inoculação.

TABELA 3 - Relação entre diferentes níveis de oxigênio dissolvido no meio, e a concentração de nitrito secretado pelas bactérias crescidas nas condições descritas na Tabela 2.

Oxigênio Dissolvido	Rotação (rpm)	Estirpe de <i>Azospirillum</i>		
		245	JA04	JA03
		Nitrito (µg/ml)		
5,48 ppm	60 + N ₂	0,00	0,73	515,75
5,53 "	60	0,20	0,02	794,12
6,87 "	100	1,67	2,53	740,66
7,44 "	150	1,08	18,37	37,52
7,66 "	200	6,35	16,20	0,44

praticamente não acumularam nitrato no meio, e mostraram um crescimento inferior à JA03. O acúmulo de nitrato no meio de crescimento da estirpe JA03 foi detectado 7 horas após o início do experimento (FIGURA 5), período que coincidiu com a fase exponencial de multiplicação das bactérias. Este teor de nitrato acumulado no meio é pelo menos cinco vezes superior àquele indicado por ZIMMER *et al.* (1988), como sendo tóxico para a estirpe Sp7. No presente caso, esta toxicidade pode ser descartada, uma vez que o crescimento das bactérias, tanto com nitrato quanto amônia, nas mesmas condições, foi idêntico (FIGURA 4). A queda na A 660nm

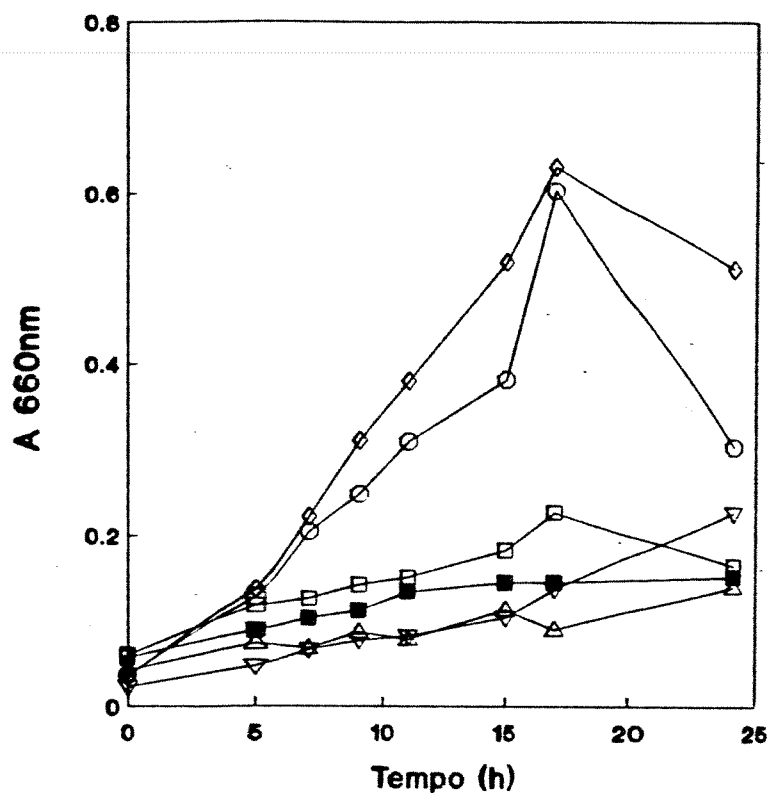


Figura 4 - Crescimento das bactérias em meio NFb líquido, contendo nitrato ou amônia. Temperatura de 30°C. Estirpe 245: +NH₄ (■), +NO₃ (□); Estirpe JA04: +NH₄ (▽), +NO₃ (△); Estirpe JA03: +NH₄ (○), +NO₃ (◇).

após 17 horas pode ser explicada pela floculação ocorrida em ambos os casos. Mesmo considerando a quantidade de nitrato produzido, calculado em função do número de células presentes no meio, fica evidente que a estirpe JA03 tem uma capacidade apreciavelmente maior de utilizar nitrato como substrato para a respiração.

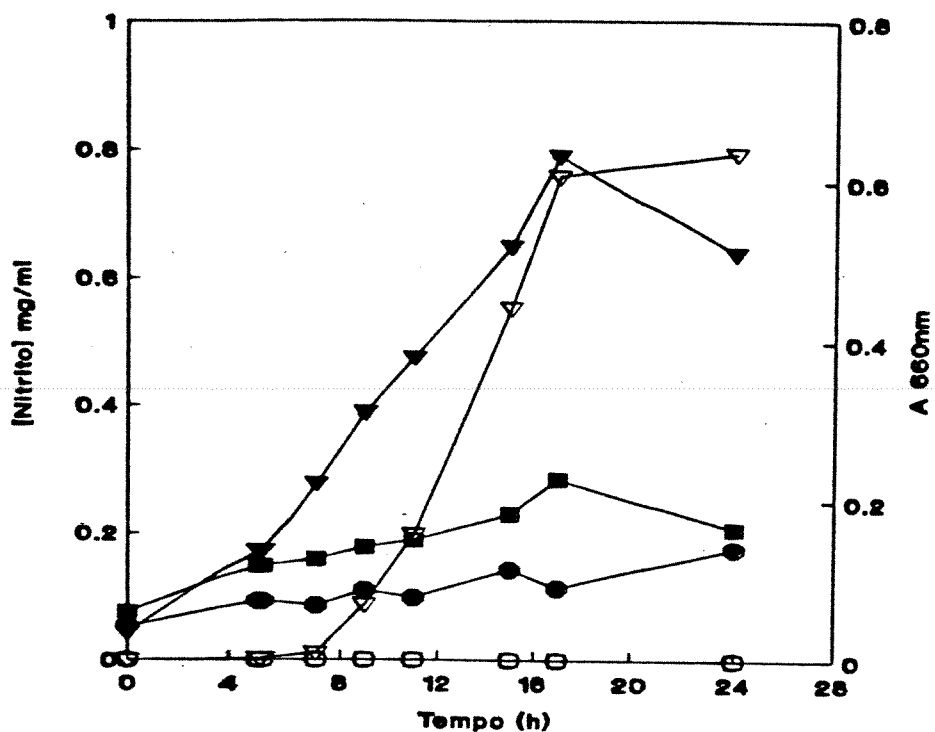


Figura 5 - Crescimento das bactérias e acúmulo de nitrito no meio de incubação. Meio NFb líquido, com agitação de 60 rpm. Temperatura de 30°C. Estirpe 245: crescimento (■), [Nitrito] (□). Estirpe JA04: crescimento (●), [Nitrito] (○). Estirpe JA03: crescimento (▼), [Nitrito] (▽).

Os resultados mostrados na FIGURA 5, indicam que a estirpe JA03 cresceu mais ativamente e acumulou maior quantidade de nitrito do que a JA04 e 245, quando mantidas em meio NFb + 2g/l de KNO_3 , sob baixa agitação (60 rpm). O aumento da agitação do meio de crescimento, de 60 para 200 rpm, provocou um incremento progressivo do número de células de 24 até 36 horas de tratamento, quando as tres estirpes apresentaram aproximadamente o mesmo número de células, assim permanecendo até transcorridas 48 horas (FIGURA 6). Paralelamente ocorreu um pequeno acúmulo de nitrito (em torno de 0,035mg/ml) nas estirpes JA04 e 245, e uma diminuição deste teor no meio de crescimento da estirpe JA03 (de 0,52 a 0,325mg/ml), que representou cerca de 50% da quantidade acumulada nas primeiras 24 horas de crescimento.

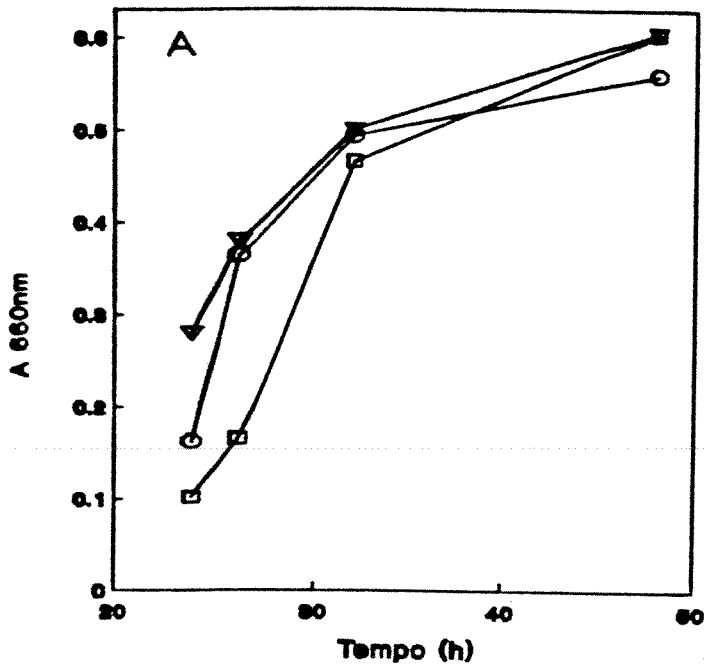
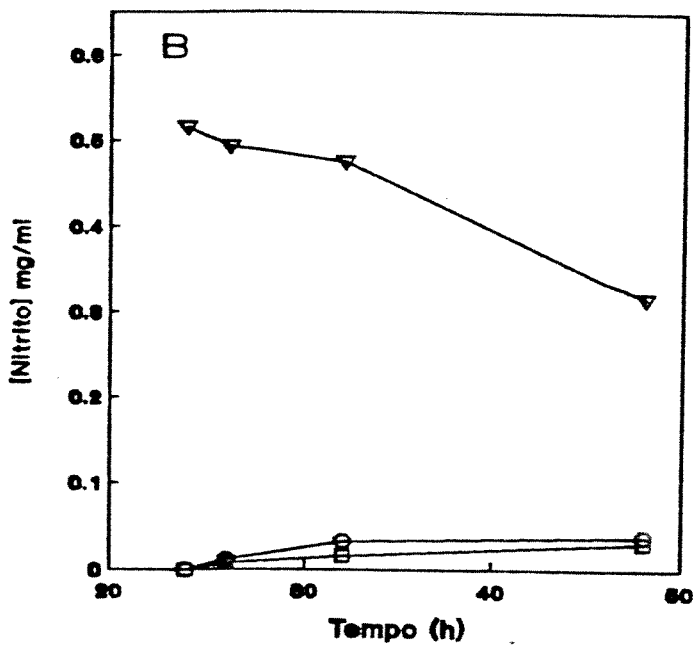


Figura 6 - (A) - Crescimento das bactérias em meio NFB líquido contendo nitrato, com aplicação de N_2 a 60 rpm durante 24 horas, submetendo-se em seguida a agitação de 200 rpm por mais 24 horas. (B) - Acúmulo de nitrito nas condições descritas em (A). Temperatura de 30°C. Estirpe 245: (□) Estirpe JA04: (○) Estirpe JA03: (▽).



Os resultados mostram que na condição de menor disponibilidade de oxigênio, a estirpe JA03 teve seu crescimento intensificado, igualando-se às demais quando submetida a maior disponibilidade de oxigênio. A introdução de N₂ no meio, afetou o crescimento da estirpe JA03, porém menos intensamente do que a JA04 e 245. Ao mesmo tempo que o crescimento foi mais intenso, a menor disponibilidade de oxigênio (5,53 ppm) também favoreceu a acumulação de nitrato no sobrenadante do meio de crescimento da estirpe JA03. A quantidade de nitrato acumulada no meio de crescimento da estirpe JA03, na concentração de O₂ de 6,87 ppm (TABELA 3), foi cerca de 20 vezes maior do que em 7,44 ppm de O₂, 740,66 µg/ml e 37,52 µg/ml, respectivamente. Nas mesmas condições, a estirpe JA04 apresentou um aumento do teor de nitrato no meio de aproximadamente 7,2 vezes, variando de 2,53 a 18,37 µg/ml, enquanto que na estirpe 245 praticamente não houve variação (1,67 para 1,06 µg/ml).

2 . Associação *Azospirillum*/raiz de trigo.

2.1 . Inoculação das sementes: efeito no desenvolvimento do sistema radicular.

Os resultados apresentados na TABELA 4 indicam que a inoculação da semente de trigo com as bactérias JA04 e 245 - *Azospirillum brasilense*, e JA03 - *Azospirillum lipoferum*, provocou um incremento do crescimento radicular, que variou de 33,3% a 47,5% em relação ao controle sem inoculação. Da mesma forma, a associação bactéria/raiz provocou aumento no peso da matéria fresca radicular entre 18,5 e 27,5% em relação ao controle. Os dados evidenciaram, também, que a inoculação afetou a diferenciação de raízes secundárias, principalmente nas plântulas cujas sementes foram inoculadas com a estirpe JA03. Este tratamento apresentou ramificação radicular mais intensa (18,3%), expressa pela porcentagem de plântulas com 5 ou mais raízes, quando comparadas com os tratamentos utilizando as estirpes 245 (4,8%) e JA04 (8,3%).

O padrão de resposta à inoculação, expresso como comprimento radicular, foi o inverso daquele apresentado para multiplicação de raízes: a estirpe 245, que apresentou o maior tamanho radicular, 47,5% em relação ao controle sem inoculação, mostrou menor ramificação radicular. As estirpes JA04 e JA03 induziram aumento do crescimento da raiz principal em 42,6 e 33,3%,

respectivamente. Analisados em conjunto, os resultados mostraram que a inoculação das sementes de trigo com bactérias do gênero *Azospirillum* promoveu o crescimento das raízes, avaliado como comprimento, peso da matéria fresca e número de raízes.

TABELA 4 - Resposta da inoculação das sementes com bactérias do gênero *Azospirillum*, no comprimento da raiz principal, peso da matéria fresca radicular e ramificação de raízes de plântulas de trigo de 4 dias de idade.

Estirpe de <i>Azospirillum</i> Inoculada (*)	Comprim. Radicular (mm)	Incr. (% Cont.)	Peso da (M.F.) Radicular (mg)		Plântulas com 5 ou mais Raízes	
			Incr. (% Cont.)	%	Difer. Controle	
245	99,3 (±4,6)	47,5	68,7 (±2,2)	21,2	4,8	1,2
JA04	96,0 (±3,2)	42,6	67,2 (±3,4)	18,5	8,3	4,7
JA03	89,7 (±4,4)	33,3	72,3 (±4,2)	27,5	18,3	14,7
Controle	67,3 (±5,9)	0	56,7 (±7,5)	0	3,6	0

(*) As bactérias foram crescidas 24h a 30°C, com agitação de 100 rpm. As sementes foram inoculadas com uma suspensão de 10⁶ células/ml.

2.2 . Acidificação do meio de crescimento das plântulas

Os valores da taxa de efluxo de prótons, obtidos a partir da alteração do pH do meio (solução nutritiva de MARSCHNER *et al.*, 1982), durante o crescimento são mostrados na FIGURA 7. Foi observado um aumento linear da taxa de efluxo de prótons durante o período de 6 horas de incubação, e uma forte inibição do processo causado pela adição de 200 µM de orto-vanadato ao meio de crescimento das raízes. Resultados comparáveis foram obtidos pela titulação do meio externo com NaOH 0.001N (dados não mostrados), em condições idênticas às descritas acima.

Utilizando-se plântulas originadas de sementes que foram inoculadas com as três estirpes de *Azospirillum*, foi determinado o efluxo de prótons pela subtração do efluxo no tratamento sem inoculação. Os resultados incluídos na TABELA 5 mostram que as raízes de plântulas inoculadas com a estirpe JA03 induziram maior acidificação do meio externo do que as estirpe 245 e JA04. Maior

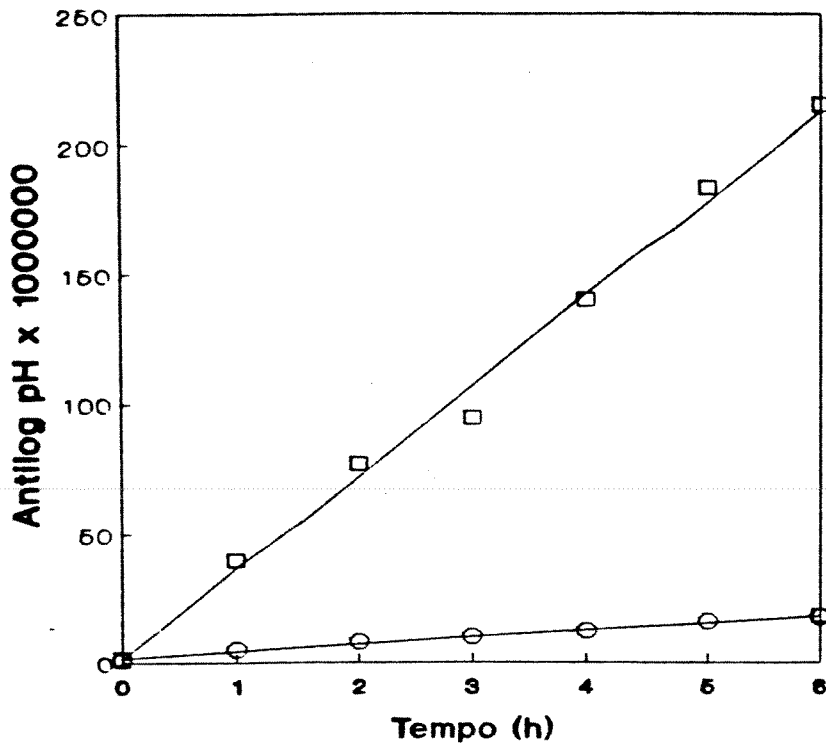


Figura 7 - Resposta da adição de orto-vanadato (200 μ M) no efluxo de prótons de raízes de plântulas intactas de trigo de 4 dias de idade. O efluxo foi calculado determinando-se o pH da solução externa. As raízes foram incubadas em solução nutritiva de MARSCHNER *et al* (1982) em recipientes apropriados envoltos em papel alumínio em câmara de incubação a 28°C, durante 6 horas. + orto-vanadato (O) - orto-vanadato (\square)

acidificação foi provocada pelas raízes das plântulas inoculadas com a estirpe JA03 na presença de NH_4^+ na solução (2.02 $\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g raiz}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), comparada com o tratamento com nitrato (0.59 $\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g raiz}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

A inoculação das raízes com bactérias da estirpe JA03 causou estimulação do efluxo de prótons em cerca de 100,8% em relação ao tratamento sem inoculação, efeito este que se mostrou sensível à inibição por orto-vanadato (TABELA 6). Apesar do orto-vanadato ter reduzido o efluxo de prótons nas raízes das plântulas inoculadas em 66.1%, comparadas com o controle sem orto-vanadato (2.47 versus 7.29 $\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g raiz}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) este efluxo foi ainda 39,5% superior ao tratamento sem inoculação (1.77 contra 2.47 $\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g raiz}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). No tratamento controle (sem inoculação), orto-vanadato reduziu o efluxo de prótons em 51.2% (3.63 contra 1.77 $\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g raiz}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

TABELA 5 - Efluxo líquido de prótons para o meio de crescimento de plântulas de trigo de 4 dias de idade, inoculadas com 3 estirpes de *Azospirillum*. (Valores médios de 6 repetições, representativas de diferentes experimentos).

Estirpe de <i>Azospirillum</i>	Efluxo líquido de prótons (*) ($\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g raiz}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
	Amônia	Nitrato
245	0,00	0,13
JA04	0,41	0,36
JA03	2,02	0,59

(*) Medido por titulação com NaOH 0,001N, num período de 6h. A solução nutritiva utilizada foi a de MARSCHNER *et al.* (1982), contendo nitrato ou amônia.

Os resultados apresentados indicam que a inoculação de sementes de trigo com bactérias do gênero *Azospirillum*, principalmente a estirpe JA03, induzem aumento do efluxo de prótons pelas raízes, e que a presença de orto-vanadato (200 μM), não mascarou totalmente este efeito.

TABELA 6 - Efluxo de prótons por raízes de plântulas de trigo de 4 dias de idade, inoculadas com a estirpe JA03, crescendo em solução nutritiva na presença de orto-vanadato.

Tratamento	Efluxo de prótons ($\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g raiz}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (*)	
	Inoculação (JA03)	Controle
Orto-vanadato 200 μM	2,47	1,77
Sem Orto-vanadato	7,29	3,63

(*) Medido por titulação com NaOH 0,001N, em solução nutritiva de MARSCHNER *et al.* (1982), contendo amônia, num período de 6h.

3. Crescimento de segmentos de raiz

3.1. Efeito do IAA e nitrito

Os resultados das alterações do peso da matéria fresca de segmentos de raiz de trigo, incubados por 18 e 48h em diferentes concentrações de nitrito são apresentados na FIGURA 8B. Os dados mostram que, em concentração de nitrito de $10^{-7}M$, ocorreu um aumento expressivo no peso dos segmentos, sendo que em concentrações superiores ou inferiores, o efeito sobre o crescimento foi menos pronunciado. O aumento do peso de matéria fresca chegou a atingir 5% após 18h de incubação, e 13% após 48h, em relação ao controle (incubação com água). O resultado do tratamento dos segmentos de raiz com IAA, indicou que o crescimento foi mais pronunciado na concentração de $10^{-7}M$ (FIGURA 8A). Em concentrações superiores ou inferiores, o aumento no peso da matéria fresca foi menor, ou praticamente nulo. O efeito do tratamento com IAA persistiu até 48 horas, quando o crescimento atingiu 9% do controle, e 3% após 18 horas de incubação. Os resultados acima descritos mostram que a adição de nitrito ou IAA ao meio de incubação dos segmentos de raiz, na concentração de $10^{-7}M$, induziu maior crescimento, razão pela qual esta foi utilizada nos experimentos seguintes, bem como o tempo de 24h de incubação, intermediário entre 18 e 48 h.

3.2. Efeito do sobrenadante do meio de crescimento da JA03

Os dados do crescimento de segmentos de raiz incubados com diferentes diluições do sobrenadante, resultante da centrifugação do meio de multiplicação das bactérias contendo KNO_3 (2g/l) e NH_4Cl (1g/l), são apresentados na FIGURA 9. O sobrenadante do meio de crescimento da estirpe JA03, em solução contendo NH_4Cl , não induziu nenhum aumento do peso da matéria fresca dos segmentos de raiz. Em contraste, a adição do sobrenadante do meio de crescimento contendo KNO_3 resultou em uma acumulação de $363,6\mu g/ml$ de nitrito, e em um acentuado aumento no peso de matéria fresca dos segmentos, quando na diluição de 1:100000, correspondente à concentração de $0,8 \times 10^{-7}M$ de nitrito. Sob estas condições, os segmentos apresentaram aumento de crescimento de 5% após 24 horas de incubação, e de 8% após 36 horas, em relação ao meio com água, utilizado como controle. Diluições superiores ou inferiores a 1:100000, mostraram-se praticamente inefetivas.

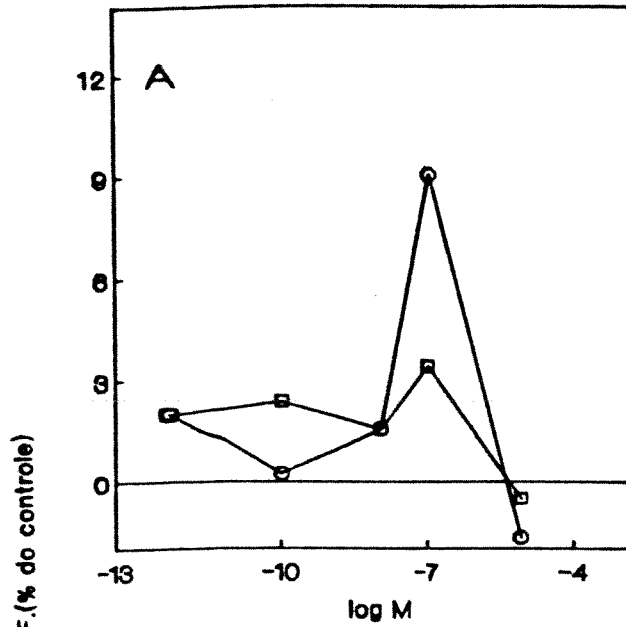
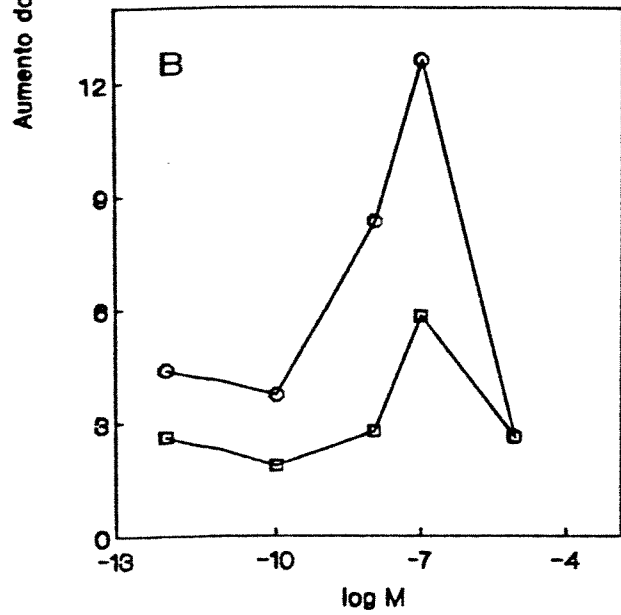


Figura 8 - Efeito da adição exógena de IAA (A) e nitrato (B) no incremento do peso de matéria fresca de segmentos de ponta de raiz de trigo, excisados de plântulas com 4 dias de idade. Tempo de incubação: 18h (□); 48h (○).



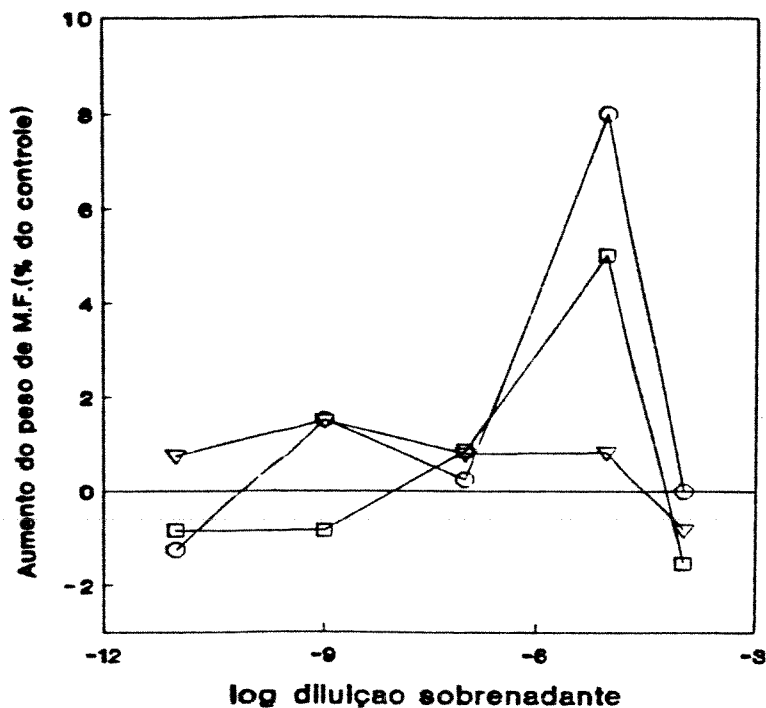


Figura 9 - Efeito da adição do sobrenadante do meio de crescimento das bactérias (estirpe JA03) no incremento do peso de matéria fresca de segmentos de ponta de raiz de trigo, incubados no escuro. As bactérias foram crescidas em meio contendo nitrato (2g/l) e amônia (1g/l). Concentração de nitrito no sobrenadante: 363,6 µg/ml. Incubação: 24 h em sobrenadante das bactérias crescidas com nitrato (□); idem, 36h (○); 36h em sobrenadante das bactérias crescidas com amônia (▽).

4. Efluxo de prótons em raízes intactas: efeito de IAA e nitrito

As taxas de efluxo de prótons observadas em raízes de plântulas intactas de trigo, submetidas à aplicação exógena de nitrito e IAA $10^{-7}M$, são apresentadas na TABELA 7A e B. Os dados indicam que, tanto o nitrito quanto IAA aplicados exogenamente ao meio radicular, induziram aumento no efluxo de prótons da ordem de 25 a 33,8% para o nitrito, e de 57,8 a 66,9% para IAA, sempre em relação ao controle. A adição de orto-vanadato $200\mu M$ (TABELA 7B) causou inibição de 44,7% no efluxo de prótons em relação ao tratamento controle, valor semelhante ao verificado no tratamento IAA + orto-vanadato (40,6%) em relação ao controle. A inibição do efluxo de H^+ no tratamento nitrito + orto-vanadato foi de apenas 2,5%. A análise do efeito do orto-vanadato no efluxo de prótons pelas raízes, provocado pela adição de IAA e nitrito, mostrou inibição do efluxo de prótons no tratamento com IAA em 64,4%, e na presença de nitrito em 27,1%.

TABELA 7 - Efeito da adição de IAA e nitrito na taxa de extrusão de prótons de raízes de plântulas intactas de trigo de 4 dias de idade.

Tratamento	Efluxo de prótons (*) ($\mu\text{mol H}^+ \cdot \text{g} \cdot \text{raiz}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
A	
Nitrito	0,785
IAA	0,991
Controle (-nitrito; -IAA)	0,628
B	
Nitrito	1,409
IAA	1,758
Orto-vanadato	0,582
IAA + Orto-vanadato	0,626
Nitrito + Orto-vanadato	1,027
Controle (-nitrito; -IAA)	1,053

(*) Efluxo de prótons medido por espectrometria (588 nm), com bromocresol púrpura 0,005%, conforme curva de calibração (FIGURA 2), em solução de MARSCHNER *et al.* (1982). As concentrações de IAA e Nitrito utilizadas foram 10^{-7}M e de orto-vanadato de $200\mu\text{M}$.

5. Efeito de drogas farmacológicas no crescimento de segmentos induzidos por IAA ou nitrito

O efeito da adição ao meio de incubação dos segmentos, de compostos que interferem no crescimento estimulado por auxina, como Procaína e trifluoperazina (TFP), é mostrado na TABELA 8. As concentrações de Procaína, um anestésico de ação local, e de TFP, antagonista da Ca-calmodulina, foram definidas em experimentos prévios como sendo $20\mu\text{M}$, dose que não alterou o peso de matéria fresca dos segmentos incubados em água por um período de até 48

horas (dados não mostrados). Os resultados indicam que a adição de Procaína causou completa reversão do efeito positivo do IAA no crescimento dos segmentos, e inibiu parcialmente o efeito do nitrito. Por outro lado, o tratamento com TFP praticamente anulou o crescimento estimulado por nitrito, enquanto que no tratamento com IAA este efeito foi apenas parcial (48,7%). Em resumo, a adição de Procaína e TFP ao meio de crescimento dos segmentos de raiz, produziu efeitos opostos sobre a inibição do aumento de peso de matéria fresca dos segmentos induzido por IAA e nitrito.

A incubação dos segmentos tratados com 20mM de lítio, um inibidor da fosfatase de fosfoinositídeo (IP₂), causou promoção do crescimento em 24 horas, efeito que foi intensificado na presença de nitrito 10⁻⁷M.

6. Efeito de reagentes SH no crescimento de segmentos induzidos por IAA e nitrito

O resultado dos tratamentos com substâncias que reagem com grupamentos sulfidrilos de proteínas, no aumento do peso de matéria fresca dos segmentos de raiz incubados por 24 horas com IAA ou nitrito, é apresentado na TABELA 9. Os reagentes SH utilizados foram diamida, iodoacetamida (Iaa), N-etilmaleimida (NEM) e p-hidroximercuribenzoato (p-HMB), nas concentrações de 0.1 mM para diamida, Iaa e NEM, e de 50µM para p-HMB. Todos os reagentes utilizados mostraram diferentes graus de inibição do efeito do nitrito e do IAA sobre o crescimento, sendo que somente o p-HMB causou inibição total em ambos os tratamentos. Iaa inibiu 100% o efeito do nitrito e em 50% o efeito do IAA; a adição de diamida e NEM causou inibição do efeito do IAA em 18,4 e 30,2%, e do efeito do nitrito em 67,2 e 78,1%, respectivamente.

TABELA 8 - Ação do IAA e do nitrito, em combinação com as drogas farmacológicas, Procaína e TFP, no incremento de peso da matéria fresca de segmentos de raiz de trigo. A determinação do efeito do Li⁺ ficou restrita ao tratamento com nitrito.

Tratamento	Varição do peso da matéria fresca dos segmentos (*) mg(%)
IAA	7,6 (±2,13) (**)
Nitrito	7,8 (±1,81)
Nitrito + Procaína	2,4 (±0,17)
Nitrito + TFP	0,8 (±0,38)
Nitrito + Lítio	9,3 (±2,85)
IAA + Procaína	0,0 (±0,40)
IAA + TFP	3,9 (±0,21)
Procaína	0,7 (±0,07)
TFP	0,8 (±0,40)
Lítio	2,9 (±0,80)

(*) Aumento do peso da matéria fresca de segmentos de raiz de trigo em relação ao controle incubado com água. Dados representativos de diferentes experimentos. As concentrações de IAA e Nitrito utilizadas foram 10^{-7} M; TFP e Procaína 20uM e Lítio 20mM. Todos os tratamentos foram incubados por 24h.

(**) Erro padrão (%) determinado à partir das diferenças em relação ao controle, em 6 repetições.

TABELA 9 - Efeito de diferentes agentes bloqueadores de grupamentos SH de proteínas, no aumento do peso da matéria fresca de segmentos de raiz de trigo tratados com IAA e nitrito.

Tratamento	Varição do peso da matéria fresca dos segmentos (*) mg(%)
Diamida	1,5 ($\pm 0,13$) (**)
laa (iodoacetamida)	0,0 ($\pm 1,20$)
NEM (N-etilmaleimida)	0,0 ($\pm 0,94$)
p-HMB (p-hidroxi-mercuribenzoato)	0,0 ($\pm 1,27$)

IAA	7,6 ($\pm 2,13$)
IAA + Diamida	6,2 ($\pm 1,27$)
IAA + laa	3,8 ($\pm 1,02$)
IAA + NEM	5,3 ($\pm 0,44$)
IAA + p-HMB	0,0 ($\pm 1,15$)

Nitrito	6,4 ($\pm 0,65$)
Nitrito + Diamida	2,1 ($\pm 1,84$)
Nitrito + laa	0,0 ($\pm 0,49$)
Nitrito + NEM	1,4 ($\pm 1,29$)
Nitrito + p-HMB	0,0 ($\pm 0,42$)

(*) Aumento do peso da matéria fresca de segmentos de raiz de trigo em relação ao controle incubado com água. Dados representativos de diferentes experimentos. As concentrações de IAA e Nitrito foram de 10^{-7} M; as concentrações de laa, Diamida e NEM foram de 0,1mM e de p-HMB de 50 μ M. Todos os tratamentos foram incubados por 24h.

(**) Erro padrão (%) determinado à partir das diferenças em relação ao controle, em 6 repetições.

V - DISCUSSÃO

Entre as bactérias promotoras do crescimento radicular de plantas (PGPR), o gênero *Azospirillum* é, provavelmente, o mais estudado nos últimos anos (BASHAN & LEVANONY, 1990). A maioria das espécies conhecidas de *Azospirillum* foi isolada de uma ampla variedade de plantas de regiões tropicais (MICHIELS *et al.*, 1989), enquanto que muito poucas referências descrevem a ocorrência destas bactérias em regiões temperadas (PENOT *et al.*, 1992).

As estirpes de *Azospirillum sp* JA03 e JA04, isoladas no sul do Brasil (Passo Fundo-RS) de raízes lavadas de trigo cultivado em área de cultivo comercial, crescem em meio NFb semi-sólido, formando película característica, e reduzem acetileno (DIDONET, A. D. & MANDEL, J. O. dados não publicados). A estirpe JA03 apresenta crescimento normal, tanto em meio NFb como em meio NFb com substituição de malato por glicose, indicando que esta estirpe pode utilizar malato ou glicose como fonte de carbono para o crescimento. Ao contrário, a estirpe JA04, da mesma maneira que a estirpe 245, não apresentou nenhum crescimento em meio contendo somente glicose como fonte de carbono (NEYRA & DOBEREINER, 1979). Quando as bactérias da estirpe JA03 foram crescidas em meio NFb semi-sólido suprido com 5 mM de NH_4NO_3 e, após formação da película, foram agitadas vigorosamente, foi rapidamente observada a formação de bolhas de ar, indicativo este de que esta espécie de *Azospirillum* tem capacidade de desnitrificação (NEYRA *et al.*, 1977). As estirpes JA04 e 245 não formaram bolhas de ar, mesmo após várias horas (DOBEREINER, 1980).

Tanto *A. brasilense* como *A. lipoferum* possuem estirpes desnitrificantes (*nir*⁺) e não desnitrificantes (*nir*), sendo que todas possuem a capacidade de reduzir NO_3^- a NO_2^- através da reação catalizada pela redutase de nitrato (*nr*⁺). Nas estirpes desnitrificantes a metabolização do nitrito ocorre pela ação da redutase de nitrito dissimilatória, responsável pela produção de gás a partir do NO_3^- (*nir*⁺), enquanto que a redutase de nitrito assimilatória (*nir*) atua na assimilação do nitrogênio utilizado para o crescimento da bactéria, e está presente em todas as estirpes (DOBEREINER, 1980).

A capacidade de utilização de glicose para o crescimento da JA03, e sua forma espiralada observada ao microscópio, além de permitir sua diferenciação das estirpes 245 e JA04, permitiu também sua classificação como *Azospirillum lipoferum*, enquanto que a JA04 foi identificada como *Azospirillum brasilense*, assim como a 245 (TARRAND *et al.*, 1978). Em relação à capacidade de desnitrificação, a estirpe JA03 foi a única das três estirpes utilizadas com a característica *nir⁺*, classificando esta bactéria como desnitrificante (NEYRA *et al.*, 1977).

A produção e excreção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas por bactérias do gênero *Azospirillum*, tem sido observada por vários autores (KAPULNIK *et al.*, 1981; REYNDERS & VLASSAK, 1982; JAIN & PATRIQUIN, 1985; OKON & KAPULNIK, 1986). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, em meio de cultura suplementado com triptofano, a produção de IAA pelas bactérias foi superior à quantidade produzida quando as bactérias cresceram em meio sem triptofano (TABELA 1). Teores comparáveis de IAA foram encontrados, tanto em *A. brasilense* como em *A. lipoferum*, por CROZIER *et al.* (1988). Segundo ZIMMER *et al.* (1988), a excreção de IAA pelas bactérias, pode ser aumentada de 6 a 8 vezes quando se adiciona triptofano ao meio, quando comparada com as bactérias crescidas em meio sem triptofano. Segundo aqueles autores, o fenômeno ocorreria devido a liberação de triptofano para o meio à medida que as bactérias morrem, geralmente após atingirem alta população no meio. Nas condições do presente trabalho isto deve ter ocorrido somente em pequena escala, uma vez que as bactérias foram crescidas somente por um período de 24 horas, e a quantidade de IAA detectada na cultura crescendo sem triptofano foi bastante baixa, quando comparamos com as culturas crescidas com triptofano. Mesmo assim, a estirpe JA03 excretou uma quantidade de IAA superior à 245 e JA04, tanto na presença como na ausência de triptofano (TABELA 1). Este fato poderia se constituir em característica positiva para esta estirpe, quando associada ao sistema radicular, pois acredita-se que o IAA produzido pela bactéria, ou sob seu estímulo, possa vir a atuar na promoção do crescimento da planta. Em alguns casos, o aumento na produção de grãos de trigo foi atribuído ao aumento do número de perfilhos, fenômeno este que está de alguma maneira sob controle hormonal (REYNDERS & VLASSAK, 1982).

Respostas observadas em trigo, como ramificação radicular e aumento do comprimento das raízes, semelhantes às mostradas na TABELA 4, também podem ser atribuídas a substâncias que interferem no crescimento da planta, como

auxinas e outros compostos (TIEN *et al.*, 1979; PATRIQUIN *et al.*, 1983; JAIN & PATRIQUIN, 1985; KUCEY, 1988; ZIMMER *et al.*, 1988). Alguns autores, no entanto, observaram que os efeitos da inoculação sobre o crescimento do sistema radicular podem desaparecer na presença de 5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980), possivelmente devido à toxidez de nitrito, como observado em alguns experimentos descritos naquele trabalho. Este aumento da extensão do sistema radicular seria responsável por maior absorção de nutrientes e, conseqüentemente, resultaria na maior produção de grãos (KAPULNIK *et al.*, 1985; BODDEY *et al.*, 1986).

Desde que a maioria das espécies de *Azospirillum* tem sido isolada de raízes de gramíneas de regiões tropicais (NEYRA & DOBEREINER, 1979), seria de esperar que estirpes originadas em clima sub-tropical fossem mais adaptadas a estas condições, principalmente no que se refere à temperatura. Assim, a observação de que as estirpes JA03 e JA04, principalmente a primeira, têm melhor crescimento em temperatura menor ou igual a 30°C (FIGURA 3), pode ser indicativo de melhor adaptação às condições de clima mais frio. Isto sem dúvida se constituiria numa vantagem, tanto no estabelecimento como na colonização das raízes de trigo nestas áreas, além da sobrevivência destas bactérias no solo. A utilização de bactérias adaptadas ou isoladas de uma mesma área, e da mesma espécie de planta, parece ser importante para se obter melhor resposta à inoculação das sementes de trigo com bactérias promotoras do crescimento, como as do gênero *Azospirillum* (BALDANI & DOBEREINER, 1980; BALDANI *et al.*, 1981; MILLET *et al.*, 1985; BARBIERI *et al.*, 1988). No entanto, muitos estudos envolvendo inoculação em trigo têm sido feitos com *Azospirillum* isolados de outras gramíneas (BASHAN *et al.*, 1986; BASHAN & LEVANONY, 1987).

A capacidade de utilizar nitrato para a respiração, está bem estabelecida em bactérias do gênero *Azospirillum* (BOTHE *et al.*, 1981; NEUER *et al.*, 1985). A disponibilidade de oxigênio no meio é fator extremamente importante para o crescimento das bactérias (ETIENNE *et al.*, 1990), tanto que na deficiência deste, estas bactérias utilizam nitrato para a respiração. Com efeito, em meio NFb líquido sem nitrogênio, foi observado que a menor agitação do meio teve forte influência no crescimento das bactérias. As estirpes JA04 e 245 praticamente não cresceram, enquanto ocorreu multiplicação da estirpe JA03, indicando adaptação a condições de baixa pressão parcial de oxigênio (TABELA 2). Alternativamente, esta estirpe pode exibir, nestas condições, elevada capacidade de utilizar N_2 atmosférico para o crescimento. Quando se adicionou 2 g/l de KNO_3 ao meio NFb sob agitação de

60 rpm, correspondente a concentração inicial de 5,53 ppm de oxigênio dissolvido, o crescimento da estirpe JA03 após 24 horas foi normal, enquanto que a 245 e JA04 sofreram forte inibição (TABELA 2). Nestas condições, o melhor crescimento exibido pela estirpe JA03 em relação às demais, deveu-se à capacidade desta bactéria em utilizar nitrato, tanto para o crescimento quanto para a respiração, e suportar elevada quantidade de nitrito no meio (FIGURA 4 e 5). A bactéria, nestas condições, acumulou até 17 mM de nitrito em 24 horas, mais de duas vezes o teor encontrado por ZIMMER *et al.*(1988) no sobrenadante da estirpe Sp7, em 48 horas de crescimento. Esta quantidade de nitrito liberado no meio de crescimento da JA03 representou mais de 20 vezes a quantidade produzida pelas estirpes 245 e JA04 nas mesmas condições, e apresentou estreita correlação com o nível de agitação durante o crescimento. Agitação acima de 100 rpm (6,87 ppm de O₂) causou drástica queda da acumulação de nitrito, possivelmente devido à denitrificação, uma vez que o teste com NH₄NO₃ em meio semi-sólido revelou que esta bactéria possui a característica *nir*⁺ (denitrificante). Alternativamente, a presença de suficiente oxigênio no meio pode ter provocado a desativação da redutase de nitrato dissimilatória. A causa da baixa atividade de denitrificação verificada em agitação abaixo de 100 rpm, ou mesmo a ausência de denitrificação em rotações superiores a 100 rpm, não foi verificada. Aparentemente ocorreu denitrificação nas condições limitantes de oxigênio no meio de crescimento, uma vez que, inequivocamente esta bactéria utilizou nitrato para o crescimento e como substrato respiratório.

Não foram encontradas referências na literatura evidenciando um acúmulo de nitrito na proporção detectada neste trabalho, por bactérias do gênero *Azospirillum*. Estudos de NEYRA & DOBEREINER (1979) mostraram que certas espécies de *Azospirillum* podem acumular nitrito por um período superior a 40 horas, sob condições limitantes de oxigênio, porém em nível nunca superior a 4 mM.

Em mutantes de *Escherichia coli* *NarK* DE MOSS & HSU (1991) demonstraram a ocorrência de síntese de uma proteína "antiporter" de nitrato/nitrito, *NarK*, a qual acoplaria a excreção de nitrito com a absorção de nitrato, facilitando desta forma a utilização do nitrato para a respiração em condições anaeróbicas. Tal situação poderia levar ao acúmulo de nitrito, sem provocar danos maiores à bactéria, uma situação semelhante ao observado neste trabalho com a estirpe JA03. A adaptação vantajosa para a bactéria, de sobreviver em ambientes semi-anaeróbicos, na presença de nitrato, aliada à característica adaptativa a ambientes estressantes, através da formação de cistos, floculação e produção de exopolissacarídeos

(SADASIVAN & NEYRA, 1985; OKON & ITZIGSOHN, 1992), provavelmente conferem alta capacidade de sobrevivência e adaptabilidade a esta bactéria. Condições de hipoxia provocada por encharcamento e compactação do solo, aliada à respiração radicular e à presença de nitrato, são bastante frequentes em áreas de cultivo de espécies econômicas.

A avaliação da resposta à inoculação das sementes de trigo com as estirpes 245, JA04 e JA03, revelou que todas causaram aumento do peso da matéria fresca, do comprimento e ramificação radicular (TABELA 4). O comprimento das raízes aumentou em 33,3% a 47,5%, dependendo da estirpe. Estes valores são superiores aos encontrados por KAPULNIK *et al.* (1985), que observaram aumento no comprimento radicular do trigo de 25 a 28%, em resposta a inoculação das sementes com *Azospirillum*. Além do comprimento, a inoculação também afetou a ramificação radicular, principalmente em resposta à utilização da estirpe JA03, que apresentou 18,3% das plântulas com cinco ou mais raízes. Aumentos semelhantes foram observados em diferentes ecossistemas, como resposta à inoculação das sementes de trigo com *Azospirillum* (KAPULNIK *et al.*, 1985; KAPULNIK *et al.*, 1987; BASHAN *et al.*, 1987; CHALK, 1991; CHRISTIANSEN-WENIGER & VAN VEEN, 1991). Além do trigo, existem referências de que o *Azospirillum* também induz o crescimento em plântulas de soja (BASHAN *et al.*, 1990), outros cereais (PATRIQUIN *et al.*, 1983) e outras espécies (SAHA *et al.*, 1985; CROSSMAN & HILL, 1987; BASHAN *et al.*, 1989a; BASHAN *et al.*, 1989b; ARSAC *et al.*, 1990). Em todos os casos, várias proposições foram levantadas para explicar o efeito da inoculação com *Azospirillum*, tais como o envolvimento de fixação biológica do nitrogênio e de substâncias reguladoras do crescimento (COHEN *et al.*, 1980; KAPULNIK *et al.*, 1981; YAHALOM *et al.*, 1984; YAHALOM *et al.*, 1990). Entretanto, até o presente nenhuma das hipóteses se revelou completamente satisfatória para explicar o fenômeno. As respostas observadas no presente trabalho parecem indicar que há envolvimento hormonal, sem descartar a ação de outros mecanismos. Das substâncias conhecidas como reguladoras do crescimento, a auxina, provavelmente, está envolvida, uma vez que o incremento no número de raízes bem como o aumento do comprimento, são fenômenos tipicamente regulados por este hormônio. As evidências experimentais convergem para a conclusão que, em meio de cultura, o *Azospirillum* sintetiza IAA e outras substâncias com atividade hormonal, embora até o momento, não se possa afirmar se esta habilidade é ou não inteiramente responsável pelos efeitos positivos quando da associação bactéria/trigo.

Um dos efeitos atribuídos às bactérias do gênero *Azospirillum*, e amplamente aceito, é o aumento na absorção de nutrientes, estimulado pela presença da bactéria associada ao sistema radicular (LIN *et al.*, 1983; KAPULNIK *et al.*, 1985; PACOVSKY *et al.*, 1985; FERREIRA *et al.*, 1987; SARIG *et al.*, 1988; PACOVSKY, 1990). O que não está esclarecido é como a colonização das raízes pelas bactérias interfere na atividade da membrana celular, induzindo o aumento da absorção iônica. A indicação de que a associação de *Azospirillum* com raízes de trigo influi na atividade da membrana plasmática, alterando a taxa de efluxo de prótons pelo sistema radicular das plantas inoculadas, foi demonstrada por BASHAN *et al.* (1989). Estes autores verificaram que raízes de plântulas de trigo inoculadas com *A. brasilense* Cd, excretaram prótons a uma taxa superior a 50% em relação às raízes de plântulas não inoculadas. Nossos resultados mostram, também, que raízes de plântulas de trigo inoculadas apresentam uma taxa mais elevada de excreção de prótons, principalmente quando a inoculação foi efetuada com a estirpe JA03 (TABELA 5 e 6). Da mesma forma que BASHAN *et al.* (1989), foi possível observar que a adição de orto-vanadato não inibiu totalmente o efluxo de prótons estimulado pela presença das bactérias de *Azospirillum* no sistema radicular (TABELA 6).

No contexto fisiológico, a queda de pH da rizosfera (excreção de prótons) está associada à troca de prótons por cátions, principalmente K^+ e NH_4^+ (PITMAN *et al.*, 1975; GLASS & SIDDIQI, 1982), resultante da atividade de bombas eletrogênicas localizadas nas membranas celulares (CHURCHILL & SZE, 1983). A força motora para a absorção ativa destes e outros íons se origina a partir do funcionamento destas bombas, que criam um potencial "trans-membrana" (SPANSWICK, 1981). É razoável admitir o envolvimento de uma H^+ -ATPase de membrana neste processo, em função da forte inibição da extrusão de H^+ por raízes não inoculadas, pela ação do orto-vanadato (COCUCCI *et al.*, 1980; BASHAN & LEVANONY, 1989), que é apenas parcial em raízes de plantas inoculadas (TABELA 6 e 7; BASHAN *et al.*, 1989). Esta alteração no efluxo de prótons de raízes de plântulas de trigo parece depender de células metabolicamente ativas de *A. brasilense*, e não é verificado na presença de outras bactérias (BASHAN, 1990). Em raízes de soja que foram inoculadas com três diferentes estirpes de *A. brasilense*, o potencial eletroquímico das células da região de alongamento foi menor quando comparado a raízes não inoculadas, efeito este não observado quando a inoculação foi efetuada com *Pseudomonas* sp. (BASHAN, 1991). Este autor levanta a hipótese de que as

bactérias em contato com a raiz, liberariam algum tipo de sinal que seria transportado até a membrana da célula, uma vez que a ocorrência da bactéria se restringe ao apoplasto. De fato, várias evidências sugerem que, apesar de as bactérias do gênero *Azospirillum* serem encontradas no interior das raízes (BALDANI *et al.*, 1986; MURTY & LADHA, 1987) ou aderidas à rizosfera (UMALI-GARCIA, *et al.*, 1980; PATRIQUIN *et al.*, 1983; OKON, 1985; BASHAN *et al.*, 1986; BASHAN & LEVANONY, 1989a; BASHAN & LEVANONY, 1989b; DEL GALLO *et al.*, 1989; BASHAN *et al.*, 1991), elas não estão em contato direto com as membranas. Desta forma, para que ocorra o efeito da bactéria no processo de excreção de prótons e na alteração do potencial "trans-membrana", a bactéria deverá gerar algum tipo de sinal que atue a nível de membrana plasmática. A excreção de NH_4^+ , observada em determinados mutantes de *Azospirillum brasilense* Sp7 (MACHADO *et al.*, 1991) que ocorrem na rizosfera, poderia criar ambiente propício para a queda do pH da parede celular, como resultado da troca por prótons.

Neste trabalho, os resultados indicam que o IAA, em concentrações hormonais, ativa o efluxo de prótons em raízes intactas de plântulas de trigo, incremento este que é fortemente inibido por orto-vanadato (TABELA 7). Em raízes de plântulas inoculadas com *Azospirillum*, a bactéria poderia secretar IAA no apoplasto induzindo efluxo de prótons, como observado em coleóptilos de aveia (BRUMMEL & HALL, 1987; SANTONI *et al.*, 1990; GONZÁLES-DARÓS *et al.*, 1993). Assim, a observação de que a associação de *Azospirillum* com o sistema radicular de trigo aumenta o efluxo de prótons (TABELA 5) de maneira semelhante àquela promovida pelo IAA (TABELA 7), poderia explicar, pelo menos em parte, o efeito da bactéria no crescimento do sistema radicular do trigo (TABELA 4). Isto seria possível, uma vez que o efluxo de prótons parece estar ligado à indução da expansão celular mediado por auxina (O'NEILL & SCOTT, 1983; FITZSIMONS, 1989; CLELAND, 1991; CLELAND *et al.*, 1991).

Foi observado, que além do IAA, o nitrito presente em concentração hormonal (10^{-7}M), provocou estímulo no efluxo de prótons em raízes intactas de plântulas de trigo, sendo o fenômeno parcialmente inibido por orto-vanadato, na mesma concentração que provocou a quase completa paralização do processo de acidificação da parede celular provocada pela adição de IAA (TABELA 7). Esta ação do orto-vanadato na resposta atribuída ao nitrito, foi bastante semelhante ao efeito que o orto-vanadato provocou no efluxo de prótons em raízes de plântulas intactas de trigo, quando inoculadas com bactérias da estirpe JA03 (TABELA 6). Esta estirpe, quando crescendo em meio de cultura contendo nitrato, acumula altos

teores de nitrato em condições de semi-anaerobiose (TABELA 3), fenômeno que pode ocorrer naturalmente no sistema radicular de plantas de trigo crescendo em condições de campo. Como ocorre com o IAA, as bactérias presentes no sistema radicular poderiam também secretar nitrato, como resultado da utilização do nitrato para a respiração, causando efluxo de prótons e, finalmente, induzindo crescimento radicular. Vale ressaltar que a estirpe JA03 foi a que acumulou maior quantidade de nitrato (TABELA 3) e IAA (TABELA 1) em meio de cultura, e induziu maior efluxo de prótons (TABELA 5), além de provocar ramificação radicular mais intensa em plântulas de trigo, quando comparada com as estirpes JA04 e 245 (TABELA 4).

Para analisar o efeito do nitrato na indução do crescimento, foi utilizado o modelo de resposta da auxina, sumarizado na FIGURA 1. Os experimentos com segmentos de raízes foram realizados com adição exógena de IAA e nitrato, além do sobrenadante obtido da estirpe JA03, crescendo com nitrato e amônia. A semelhança das curvas de dose-resposta obtidas para IAA, nitrato e com o sobrenadante obtido da estirpe JA03, somente quando crescida utilizando nitrato, (FIGURA 8 e 9), sugere que nitrato estaria exercendo influência hormonal no crescimento das células da raiz. As respostas positivas na promoção do crescimento foram obtidas em concentração de nitrato na faixa de ação hormonal, sendo que as concentrações mais altas resultaram em inibição do processo. De fato, UMALI-GARCIA *et al.* (1980) não observaram resposta da inoculação com *Azospirillum* na presença de 5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, provavelmente devido à produção muito elevada de nitrato pela bactéria. ZIMMER *et al.* (1988) também observaram efeito tóxico do nitrato em concentrações elevadas, e efeito estimulatório em concentrações hormonais. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que somente uma quantidade adequada de bactérias teria a capacidade de produzir suficiente nitrato e/ou IAA para desencadear a expansão celular. Foi observado, também, que a adição simultânea de nitrato e auxina não provocou efeito antagônico na promoção do crescimento.

A observação de que a produção e excreção de IAA por *Azospirillum* requer triptofano e oxigênio (ZIMMER *et al.*, 1988; FRITZCHE *et al.*, 1991), contrasta com as condições que favorecem a produção de nitrato pelas bactérias, a partir de nitrato.

O aumento da acidificação do apoplasto induzido por IAA (TABELA 7), é um fenômeno amplamente registrado na literatura (BRUMMER *et al.*, 1985; KUTSHERA & SCHOPFER, 1985; CLELAND, 1986; BRUMMEL & HALL, 1987; GRIGNON & SENTENAC, 1991), tendo os autores demonstrado que o efluxo de prótons, e a

consequente hiperpolarização da membrana, envolve a atividade de uma H⁺-ATPase e um incremento da absorção de K⁺. Tanto a hiperpolarização da membrana, como a absorção de íons K⁺, induzidos por IAA, são afetados por inibidores de ATPase de membrana plasmática, como eritrosina B e procaína (BATES & GOLDSMITH, 1983; BRUMMER *et al.*, 1985). A evidência de que a procaína anula totalmente o efeito estimulatório do IAA no crescimento dos segmentos de raiz (TABELA 8), pode ser interpretada como resultado da ação da droga na despolarização da membrana. Este efeito de despolarização causaria diminuição da absorção de íons, principalmente K⁺, resultando na alteração do potencial osmótico da célula e, conseqüentemente, da entrada de água, parализando o crescimento. BRUMMER *et al.* (1985) sugeriram que o efeito da procaína em raízes de milho estaria associado à inibição do bombeamento de prótons do citoplasma, devida ao aumento do pH citossólico causado pela procaína, que é uma base fraca, e anulando o efeito de acidificação citoplasmática provocada pela auxina. Como decorrência, a atividade da H⁺-ATPase da plasmalema não seria estimulada, impedindo a acidificação da parede celular, condição necessária para o relaxamento da parede e a promoção do crescimento do tecido (MASUDA, 1978; CLELAND, 1983; FRY, 1989). A análise dos resultados obtidos neste trabalho permite a interpretação do efeito do ortovanadato no efluxo de prótons provocado pelo IAA (TABELA 7), decorrente da inibição da atividade da H⁺-ATPase (COCUCCI *et al.*, 1980). Recentemente MCQUEEN-MASON *et al.* (1992) sugeriram que auxina induz a síntese de proteínas de parede celular com atividade hidrolítica, que atuam no relaxamento da parede, mediando a resposta do crescimento devido à auxina.

Além do efeito despolarizante de membrana, a procaína atua na distribuição de Ca₂⁺, nos compartimentos celulares, seja de forma antagônica ou agonística, interferindo na resposta do IAA (LOW *et al.*, 1979; WOLNIAK *et al.*, 1980; TAKISHIMA *et al.*, 1980; BRUMMEL & HALL, 1987; GONZÁLES-DARÓS *et al.*, 1993). O efeito da procaína e da trifluoperazina (TFP) sobre o crescimento mediado por IAA (TABELA 8) pode ser interpretado pela alteração na homeostase do cálcio citoplasmático, possivelmente relacionado à atividade da cálcio-calmodulina (ELLIOT *et al.*, 1983; RAGHOTHAMA *et al.*, 1985; OLBE & SOMMARIN, 1991; GONZÁLES-DARÓS *et al.*, 1993). O efeito da procaína na despolarização da membrana, e na alteração da concentração de Ca²⁺ livre no citoplasma, sugere a ocorrência de uma inibição mais acentuada da resposta do IAA por procaína do que por TFP, que atua como um antagonista da Ca-calmodulina, mas não afeta a despolarização da membrana.

Assim, TFP estaria agindo na chamada segunda fase de resposta da auxina, com a inibição parcial do efeito estimulante do IAA, enquanto que a procaina afetaria fortemente as duas fases de resposta da auxina, como observado na TABELA 8. Os efeitos do TFP e procaina associados as respostas da auxina, também podem ser interpretados em função do conhecido papel do cálcio como segundo mensageiro na regulação do crescimento celular (HEPLER & WAYNE, 1985; BACHS *et al.*, 1992), provavelmente envolvendo o metabolismo dos fosfoinosítídeos (MORSE *et al.*, 1989; JOHANNES *et al.*, 1991; BOITANO *et al.*, 1992; DROBAK, 1992).

As respostas da auxina na promoção do crescimento por alongamento, são consideradas dependentes da ligação do hormônio com proteínas específicas, "auxin-binding proteins", que desencadeariam os eventos descritos como transdução de sinal a nível de membrana plasmática e nuclear (LOBLER & KLAMBT, 1985; ANDRÉ *et al.*, 1991; VENIS & NAPIER, 1991; JONES & PRASAD, 1992; DARGINAVICIENE *et al.*, 1992). Assim, bloqueadores específicos de grupamentos SH de proteínas, como p-HMB, IAA, diamida e NEM, poderiam estar envolvidos na ação da auxina sobre o crescimento, interferindo no processo de mediação desempenhado pelas proteínas receptoras. Com excessão do p-HMB, todos os outros bloqueadores SH influenciaram parcialmente o efeito do IAA (TABELA 9), indicando que proteínas com grupamentos SH livres são importantes para a manifestação da resposta do IAA. Considerando os diferentes modos de ação dos vários reagentes SH empregados, pode-se inferir que as proteínas responsáveis pela recepção e/ou desencadeamento da ação da auxina, provavelmente possuem grupamentos SH, tanto nos sítios hidrofóbicos quanto hidrofílicos das proteínas em questão (TAKISHIMA *et al.*, 1980; PÁVÓ & FAHRENHOLZ, 1990; IWAARDEN *et al.*, 1992). Alternativamente, os efeitos produzidos pela adição dos reagentes IAA, diamida e NEM, estariam indicando que somente a segunda fase de resposta do IAA envolveria proteínas com grupamentos SH reduzidos, localizados nas membranas, e que a inibição total provocada pelo p-HMB seria resultante do seu efeito nas duas fases do crescimento por alongamento.

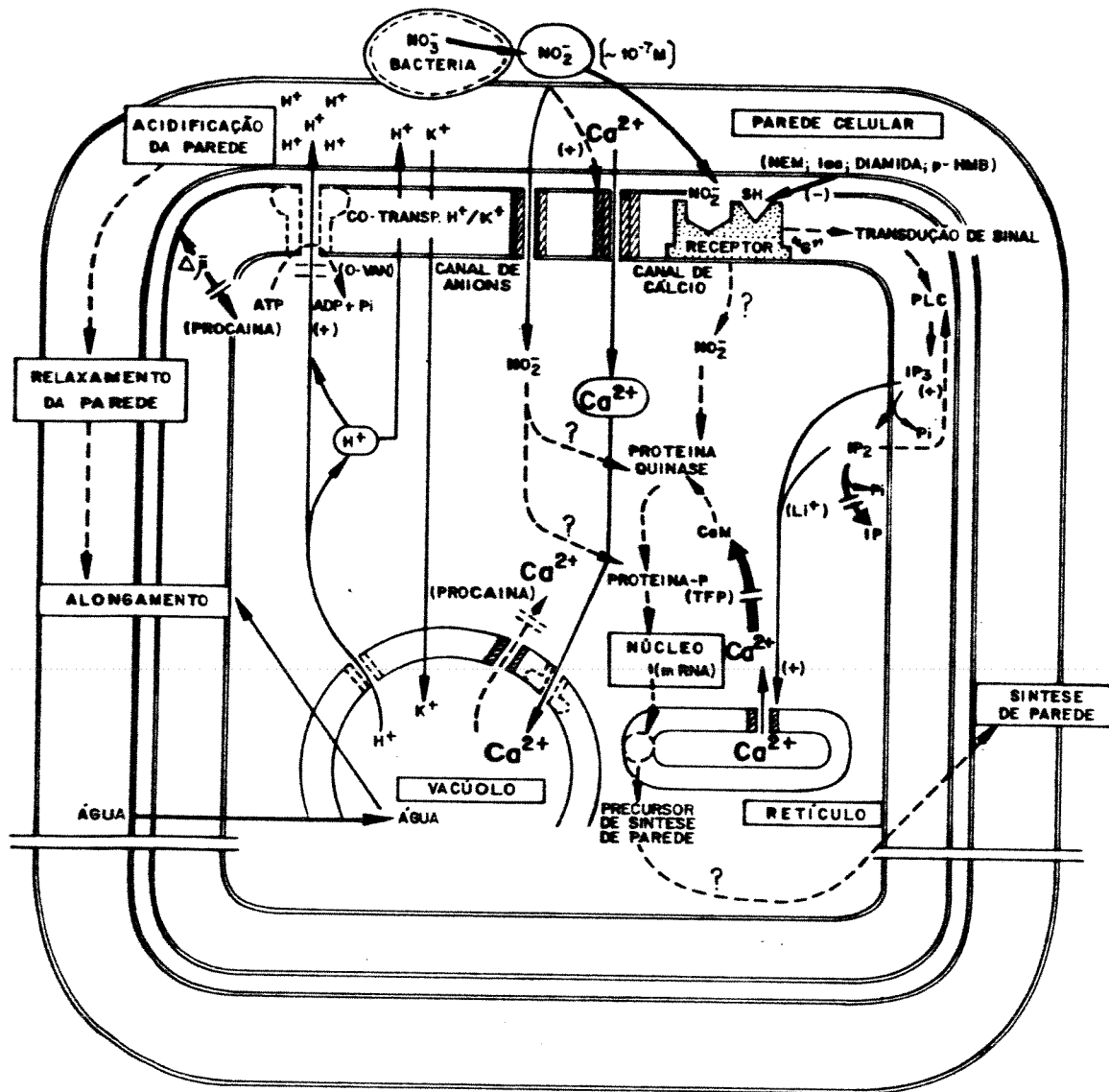


Figura 10 - Visualização esquemática do mecanismo de ação do nitrito no crescimento de raízes de trigo inoculadas com bactérias do gênero *Azospirillum*. Estão indicados (traços em negrito) os processos estudados no presente trabalho, complementados por observações de outros autores, referentes à promoção de crescimento mediado por auxinas. **Legenda:** PLC - fosfolipase C; NEM - N-etilmaleimida; Iaa - iodoacetamida, O-VAN - orto-vanadato; p-HMB - p-hidroximercuribenzoato; TFP - trifluorperazina; $\text{IP}_3, \text{IP}_2, \text{IP}$ - fosfoinositídeos; CaM - cálcio-calmodulina; $\Delta \mu$ - gradiente de potencial trans-membrana; "G" - proteína transdutora de sinal; CO-TRANNSP - co-transporte na membrana.

A comparação e a interpretação dos resultados obtidos pela aplicação exógena de nitrito e IAA permitiu a elaboração do modelo mostrado na FIGURA 10, onde estão descritas algumas etapas do mecanismo de ação do nitrito associado ao crescimento de plântulas de trigo. Segundo esta interpretação é possível que nitrito, presente em concentrações semelhantes a concentrações efetivas do IAA, expresse uma ação do tipo hormonal sobre o crescimento, comparável ao efeito do IAA, porém, apresentando algumas características particulares de ação. A observação de que nitrito atuaria como substância hormonal, e a demonstração do seu envolvimento nas respostas de estimulação do crescimento atribuído à inoculação de sementes de trigo com *Azospirillum*, foram descritas por ZIMMER *et al.* (1988) e BOTHE *et al.* (1992). Estes autores mostraram que o nitrito induz crescimento e ramificação radicular de plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum*. Os dados deste trabalho confirmam aqueles resultados mas não descartam os eventuais efeitos do IAA ou outras substâncias com atividade hormonal produzidas pelas bactérias, sobre o crescimento das raízes nas plantas inoculadas com *Azospirillum*.

Como relatado anteriormente, a procaína afetou somente de forma parcial a resposta do nitrito, indicando que, ao contrário do IAA, a manutenção de um gradiente eletroquímico na membrana parece não ser tão importante para a resposta do nitrito. A influência do TFP, e também do lítio, nos segmentos tratados com nitrito, poderia estar ocorrendo via um mecanismo envolvendo os fosfoinosítídeos, IP_3 e IP_2 , alterando o teor do cálcio nos compartimentos celulares (MARTINOIA *et al.*, 1993) (TABELA 8).

A partir dos resultados obtidos sugere-se que a resposta do nitrito no crescimento radicular estaria associada à presença de receptores específicos na membrana que, à semelhança do IAA, seriam denominados "nitrite-binding proteins". A utilização de agentes bloqueadores de grupamentos SH de proteínas indicam a presença destes possíveis receptores, cujas atividades dependeriam da manutenção de grupos SH reduzidos. A forte inibição provocada pelo tratamento com p-HMB e IAA, que são menos permeáveis à membrana do que NEM e diamida, indicam que o provável receptor do nitrito possui grupamentos SH funcionais na face externa da membrana, em contato com a parede celular. Também o efeito inibitório de NEM e diamida (TABELA 9), que são permeáveis à membrana, sugere que os receptores possuem grupamentos SH também na face citoplasmática da membrana. É possível que este(s) receptor(es) apresentem características de

proteínas integrais da membrana, uma vez que p-HMB reage mais eficientemente com grupamentos SH localizados no interior da molécula de proteína, além de atuar especificamente como inibidor do transporte de nitrito na plasmalema (ASLAM *et al.*, 1992).

O possível envolvimento de proteínas receptoras de nitrito, a associação com processos dependentes da homeostase de Ca^{2+} , e a dependência da atividade da Ca-calmodulina, sugerem que o efeito do nitrito na promoção da expansão celular ocorre via síntese de material de parede celular. O processo de sustentação do crescimento ocorreria através de mecanismo semelhante ao proposto para o efeito da auxina, na segunda fase de resposta. Os dados apresentados mostram que o nitrito também afeta a primeira fase de resposta, ou seja, o crescimento ácido proposto para a ação da auxina. Diferentemente do efeito do IAA, o efluxo de prótons estimulado pelo nitrito é menos sensível ao orto-vanadato, indicando que a acidificação do meio dependeria apenas em parte da atividade da H^+ -ATPase da plasmalema, mas fortemente associado ao mecanismo "antiporter" H^+/K^+ , conforme proposto por FELLE (1988) e RAYLE & CLELAND (1992). O sistema "antiporter" depende da hiperpolarização da membrana, como resultado da atividade, por exemplo, de uma NADH-desidrogenase trans-membrana (FEDERICO & GIARTOSIO, 1983). A aquisição de K^+ e o transporte de outras substâncias osmoticamente ativas, poderiam criar as condições apropriadas de potencial osmótico para promover o alongamento celular.

De acordo com LEE (1979), é pouco provável a ocorrência de toxicidade de nitrito nas raízes de cereais, mesmo em solos temporariamente alagados, a não ser sob circunstâncias anormais. Vários autores demonstraram a existência de um mecanismo de absorção ativa de nitrito, que é rapidamente reduzido pela redutase de nitrito no sistema radicular (TOMPKINS *et al.*, 1978; BRETELER & LUCZAK, 1982; GOYAL & HUFFAKER, 1986; AGUERA *et al.*, 1990; ASLAM *et al.*, 1992; SIDDIQI *et al.*, 1992). A fumigação de plantas de cevada com uma mistura de NO_2^- e NO em concentração adequada, estimulou a produtividade (MURRAY *et al.*, 1992), demonstrando que o nitrito pode conferir efeitos benéficos para a planta. No solo, o nitrito pode interagir com vários compostos orgânicos (AZHAR *et al.*, 1986), e a sua concentração dependerá do conteúdo de água deste solo, que influencia a atividade dos microorganismos nitrificantes e denitrificantes. Em solo com 18% de umidade a quantidade de nitrito no rizoplane de raízes de cevada pode variar de 50 a 100 mmol de N- NO_2^- /g de raiz, na camada superficial (até 10 cm de profundidade)

(BINNERUP & SORENSEN, 1992). Esta região do solo, próxima à raiz, sofre influência de diversos tipos de microorganismos, tanto nitrificantes quanto denitrificantes, e de microorganismos outros que podem produzir substâncias hormonais diversas (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1991). Segundo ZIMMER *et al.* (1988) e BOTHE *et al.* (1992), bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de produzir nitrito em concentrações hormonais pela respiração. Estes resultados mostram que as estirpes de *Azospirillum* que predominam no sistema radicular de gramíneas não produzem N_2O ou N_2 a partir de nitrito (BALDANI & DOBEREINER, 1980).

A presença de nitrato em solos agricultáveis possibilita a produção de nitrito por bactérias do gênero *Azospirillum*, pela ação da redutase de nitrato dissimilatória, nitrito este que, mesmo em baixas concentrações ($10^{-7}M$) pode apresentar atividade hormonal, induzindo o crescimento das raízes, influenciando particularmente a zona de alongamento. As evidências encontradas neste trabalho, fornecem informações para o conhecimento dos efeitos da inoculação com *Azospirillum* em plantas de trigo, as quais incluem importantes efeitos da bactéria na ativação de vários sistemas metabólicos, que resultam no crescimento da planta.

VI - LITERATURA CITADA

- ABBOTT, R.E. & SCHACHTER, D. 1976 - Impermeant maleimides. - Oriented probes of erythrocyte membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, 251:7176-7183.
- AGUERA, E.; HABA, P. de la; FONTES, A. G. & MALDONADO, J.M. 1990 Nitrate and nitrite uptake and reduction by intact sunflower plants. *Planta*, 182:149-154.
- ANDRÉ, B. & SCHERER, F. E. 1991 - Stimulation by auxin of phospholipase A in membrane vesicles from an auxin-sensitive tissue is mediated by auxin receptor. *Planta*, 185:209-214.
- ARSAC, J. F.; LAMOTHE, C. MULARD, D. & FAGES, J. 1990 - Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie*, 10:640-654.
- ARSHAD, M. & FRANKENBERGER, W. T. 1991 - Microbial production of plant hormones. *Plant Soil*, 133:1-8.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L. & HUFFAKER, R. C. 1992 - Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, 99:1124-1133.
- AUGUR, C.; YU, L.; SAKAI, K.; OGAWA, T.; SINAY, P.; DARVILL, A. G. & ALBERSHEIM, P. 1992 - Further studies of the ability of xyloglucan oligosaccharides to inhibit auxin-stimulated growth. *Plant Physiol.*, 99:180-185.
- AZHAR, E. S.; VERHE, R.; PROOT, M.; SANDRA, P. & VERSTRAETE, W. 1986 - Binding of nitrite-N on polyphenols during nitrification. *Plant Soil*, 94:369-382.
- BACHS, O.; AGELL, N. & CARAFOLI, E. 1992 - Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochim. Biophys. Acta*, 1113:259-270.

- BALDANI, V. L. D. & DOBEREINER, J. 1980 - Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 12:433-439.
- BALDANI, J. I.; PEREIRA, P. A. A.; da ROCHA, R. E. M. & DOBEREINER, J. 1981 - Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp. em plantas com via fotossintética C3 e C4. *Pesq. Agropec. Bras.*, 16:325-330.
- BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. 1986 - Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field wheat and sorghum. *Plant Soil*, 90:35-46.
- BARAK, R.; NUR, I. & OKON, Y. 1983 - Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Appl. Bacteriol.*, 53:399-403.
- BARBER, L. E.; TJEPKEMA, J. D.; RUSSEL, S. A. & EVANS, H. J. 1976 - Acetylene reduction (nitrogen fixation) associated with corn inoculated with *Spirillum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:108-113.
- BARBIERI, P.; BERNARDI, A.; GALLI, E. & ZANETTI, G. 1988 - Effects of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on wheat roots development. In: W. Klingmüller (ed.). *Azospirillum* IV. Genetics, physiology, ecology. Springer-Verlag, Berlin, New York. pp. 181-188.
- BASHAN, Y. 1986 - Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd, following temporary depression of the rhizosphere microflora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:1067-1071.
- BASHAN, Y. 1986a - Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.*, 18:297-301.
- BASHAN, Y. 1990 - Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux of intact wheat roots. *Can. J. Microbiol.*, 36:419-425.

- BASHAN, Y. 1991 - Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone cells induced by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, 37:958-963.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. 1987 - Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbiol.*, 133:3473-3480.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. 1988 - Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. *J. Gen. Microbiol.*, 134:1811-1820.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. 1988a - Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to a light-textured soil by protein bridging. *J. Gen. Microbiol.*, 134:2269-2279.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. 1989 - Effect of root environment on proton efflux in wheat roots. *Plant Soil*, 119:191-197.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. 1989a - Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Can. J. Microbiol.*, 35:936-944.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. 1989b - Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.*, 135:2899-2908.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. 1990 - Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*, 36:591-608.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. & KLEIN, E. 1986 - Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 132:3069-3073.

- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. & ZIV-VECHT, O. 1987 - The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. *Can. J. Microbiol.*, 33:1074-1079.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. & MITIKU, G. 1989 - Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.*, 35:691-697.
- BASHAN, Y.; SINGH, M. & LEVANONY, H. 1989a - Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Can. J. Bot.*, 67:2429-2434.
- BASHAN, Y.; REAM, Y.; LEVANONY, H. & SADE, A. 1989b - Non-specific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.*, 67:1317-1324.
- BASHAN, Y.; HARRISON, S. K. & WHITMOYER, R. E. 1990 - Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:769-775.
- BASHAN, Y.; MITIKU, G.; WHITMOYER, R. E. & LEVANONY, H. 1991 - Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant Soil*, 132:73-83.
- BATES, G. W. & GOLDSMITH, M. H. M. 1983 - Rapid response of the plasma-membrane potential in oat coleoptile to auxin and other weak acids. *Planta*, 159:231-237.
- BATT, E. R.; ABBOTT, R. E. & SCHACHTER, D. 1976 - Impermeant maleimides. - Identification of an exofacial component of the human erythrocyte hexose transport mechanism. *J. Biol. Chem.*, 251:7184-7190.
- BERG, R. H.; TYLER, M. E.; NOVICK, N. J.; VASIL, V. & VASIL, I. K. 1980 - Biology of *Azospirillum*-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:642-649.

- BINNERUP, S. J. & SORENSEN, J. 1992 - Nitrate and nitrite microgradients in barley rhizosphere as detected by a highly sensitive denitrification bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2375-2380.**
- BODDEY, R. M. & VICTÓRIA, R. L. 1986 - Estimation of biological fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. *Plant Soil*, 90:265-292.**
- BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. 1986 - Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant Soil*, 95:109-121.**
- BOITANO, S.; DIRKSEN, E. R. & SANDERSON, M. J. 1992 - Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science*, 258:292-295.**
- BOTHE, H.; KEIN, B.; STEPHAN, M. P. & DOBEREINER, J. 1981 - Transformation of inorganic nitrogen by *Azospirillum* spp. *Arch. Microbiol.*, 130:96-100.**
- BOTHE, H.; KORSGEN, H.; LEHMACHER, T. & HUNDESHAGEN, B. 1992- Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. *Symbiosis*, 13:167-179.**
- BRADSHAW-ROUSE, J. J.; WHATLEY, M. H.; COPLIN, D. L.; WOODS, A.; SEQUEIRA, L. & KELMAN, A. 1981 - Agglutination of *Erwinia stewartii* strains with a corn agglutinin: correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:344-350.**
- BRETELER, H. & LUCZAK, W. 1982 - Utilization on nitrite and nitrate by dwarf bean. *Planta*, 156:226-232.**
- BRONS, H. J. & ZEHNDER, A. J. B. 1990 - Aerobic nitrate and nitrite reduction in continuous culture of *Escherichia coli* E4. *Arch. Microbiol.*, 153:531-536.**
- BRUMMELL, D. A. & HALL, J. L. 1987 - Rapid cellular responses to auxin and the regulation of growth. *Plant Cell Environ.*, 10:523-543.**

- BRUMMER, B.; BERTL, A.; POTRYKUS, I.; FELLE, H. & PARISH, R. W. 1985 - Evidence that fusicoccin and indole-3-acetic acid induce cytosolic acidification of *Zea mays* cells. *FEBS Let.*, 189:109-114.
- CHALK, P. M. 1991 - The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. *Plant Soil*, 132:29-39.
- CHRISTIANSEN-WENIGER, C. & VAN VEEN, J. A. 1991 - NH_4^+ -excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:3006-3012.
- CHRISTIANSEN-WENIGER, C.; GRONEMAN, A. F. & VAN VEEN, J. A. 1992 - Associative N_2 fixation and root exudation of organic acids from wheat cultivars of different aluminium tolerance. *Plant Soil*, 139:167-174.
- CHURCHILL, K. A. & SZE, H. 1983 - Anion-sensitive, H^+ -pumping ATPase in membrane vesicles from oat roots. *Plant Physiol.*, 71:610-617.
- CLELAND, R. E. 1983 - The capacity for acid-induced wall loosening as a factor in the control of *Avena* coleoptile cell elongation. *J. Exp. Bot.*, 34:676-680.
- CLELAND, R. E. 1986 - The role of hormones in wall loosening and plant growth. *Austr. J. Plant Physiol.*, 13:93-103.
- CLELAND, R. E. 1991 - The outer epidermis of *avena* and maize coleoptiles is not a unique target for auxin in elongation growth. *Planta*, 186:75-80.
- CLELAND, R. E.; BUCKLEY, G.; NOWBAR, S.; LEW, N. M.; STINEMETZ, C.; EVANS, M. L. & RAYLE, D. L. 1991 - The pH profile for acid-induced elongation of coleoptile and epicotyl sections is consistent with the acid-growth theory. *Planta*, 186:70-74.
- COCUCCI, M.; BALLARIN-DENTI, A. & MARRE, M. T. 1980 - Effect of orthovanadate on H^+ secretion, K^+ uptake, electric potential difference and membrane ATPase activities of higher plant tissues. *Plant Sci. Lett.*, 17:391-400.

- COHEN, E.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I. & HENIS, Y. 1980 - Increases in dry weight and total nitrogen in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Plant Physiol.*, 66:746-749.
- CROSSMAN, S. M. & HILL, W. A. 1987 - Inoculation of sweet potato with *Azospirillum*. *Hort. Sci.*, 22:420-422.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIN, J. M.; MONTEIRO, A. M. & SANDBERG, G. 1988 - Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2833-2837.
- DARGINAVICIENE, J. V.; MERKYS, A. J.; ULEVICIENE, R. R.; ZEMANAS, J. A. & MAKSIMOV, G. B. 1992 - IAA-binding properties of the plasmalemma of wheat coleoptiles. *Soviet Plant Physiol.*, 39:151-157.
- DEL GALLO, M.; NEGI, M. & NEYRA, C. A. 1989 - Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, 171:3504-3510.
- DE MOSS, J. A. & HSU, P-Y. 1991 - *NarK* enhanced nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173:3303-3310.
- DOBEREINER, J. 1980 - Forage grasses and grain crops. In: F. J. Bergensen (ed). *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, pp. 535-555.
- DROBAK, B.K. 1992 - The plant phosphoinositide system. *Biochem. J.*, 288:697-712.
- ELLIOTT, D. C.; BATCHELOR, S. M.; CASSAR, R. A. & MARINOS, N. G. 1983 - Calmodulin-binding drugs affect responses to cytokinin, auxin, and gibberellic acid. *Plant Physiol.*, 72:219-224.
- ELMERICH, C. 1984 - Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. *Biotechnology*, 2:967-978.

- ETIENNE, P.; MULARD, D.; BLANC, P.; FAGES, J.; GOMA, G. & PAREILLEUX.
1990 - Effects of partial O₂ pressure, partial CO₂ pressure, and agitation on growth kinetics of *Azospirillum lipoferum* under fermentor conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:3235-3239.
- ETZLER, M. E. 1985 - Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 36:209-234.
- FEDERICO, R. & GIARTOSIO, C. E. 1983 - A transmembrane electron transport system in maize roots. *Plant Physiol.*, 73:182-184.
- FELLE, H. 1988 - Short-term pH regulation in plants. *Physiol. Plant.*, 74:583-591.
- FERREIRA, M. C. B.; FERNANDES, M. S. & DOBEREINER, J. 1987 - Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. *Biol. Fert. Soils*, 4:47-53.
- FITZSIMONS, P. J. 1989 - The determination of sensitivity parameters for auxin-induced H⁺-efflux from *Avena* coleoptile segments. *Plant Cell Environ.*, 12:737-746.
- FRITZSCHE, C.; HUCKFELDT, K. & NIEMANN, E. -G. 1991 - Ecophysiology of associative nitrogen fixation in a rhizosphere model in pure and mixed culture. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 85:279-292.
- FRY, S. C. 1989 - Cellulases, hemicellulases and auxin-stimulated growth: A possible relationship. *Physiol. Plant.*, 75:532-536.
- GLASS, A. D. M. & SIDDIQI, M. Y. 1982 - Cation-stimulated H⁺ efflux by intact roots of barley. *Plant Cell Environ.*, 5:385-393.
- GONZÁLEZ-DARÓS, F.; CARRASCO-LUNA, J.; CALATAYUD, A.; SALGUERO, J. & VALLE-TASCÓN, S. del, 1993 - Effects of calmodulin antagonists on auxin-stimulated proton extrusion in *Avena sativa* coleoptile segments. *Physiol. Plant.*, 87:68-76.

- GOYAL, S. S. & HUFFAKER, R. C. 1986 - The uptake of NO_3^- , NO_2^- and NH_4^+ by intact wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, 82:1051-1056.
- GRIGNON, C. & SENTENAC, H. 1991 - pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42:103-128.
- HAAHTELA, K.; WARTIOVAARA, T.; SUNDMAN, V. & SKUJINS, J. 1981 - Root-associated N_2 fixation (acetylene-reduction) by enterobacteriaceae and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:203-206.
- HAGER, A.; DEBUS, G.; EDEL, H. -G.; STRANSKY, H. & SERRANO, R. 1991 - Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H^+ -ATPase. *Planta*, 185:527-537.
- HEINRICH, D. & HESS, D. 1985 - Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. *Can. J. Microbiol.*, 31:26-31.
- HEPLER, P. K. & WAYNE, R. D. 1985 - Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 36:397-439.
- HOSON, T.; MASUDA, Y. & NEVINS, D. J. 1992 - Comparison of the outer and inner epidermis. Inhibition of auxin-induced elongation of maize coleoptiles by glucan antibodies. *Plant Physiol.*, 98:1298-1303.
- IWAARDEN, P. R. van; DRIESSEN, A. J. M. & KONINGS, W. N. 1992 - What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins. *Biochem. Biophys. Acta*, 1113:161-170.
- JAIN, D. K. & PATRIQUIN, D. G. 1985 - Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.*, 31:206-210.
- JOHANNES, E.; BROSANAN, J. M. & SANDERS, D. 1991 - Calcium channels and signal transduction in plant cells. *BioEssays*, 13:331-336.

- JONES, A. M. & PRASAD, P. V. 1992 - Auxin-binding proteins and their possible roles in auxin-mediated plant cell growth. *BioEssays*, 14:43-48.
- JONES, A. M. & HERMAN, E. M. 1993 - KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol.*, 101:595-606.
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I. & HENIS, Y. 1981 - Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain Cd). *Plant Physiol.*, 68:340-343.
- KAPULNIK, Y.; GAFNY, R. & OKON, Y. 1985 - Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃⁻ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Can. J. Bot.*, 63:627-631.
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y. & HENIS, Y. 1987 - Yield response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. *Biol. Fertil. Soils.*, 4:27-35.
- KUCEY, R. M. N. 1988 - Plant growth-altering effects of *Azospirillum brasilense* and Bacillus C-11-25 on two wheat cultivars. *J. Appl. Bacteriol.*, 64:187-196.
- KUTSCHERA, U. & SCHOPFER, P. 1985 - Evidence against the acid growth theory of auxin action. *Planta*, 163:483-493.
- LAMM, R. & NEYRA, C. A. 1981 - Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. *Can. J. Microbiol.*, 27:1320-1325.
- LEE, R. B. 1979 - The effect on nitrite on root growth of barley and maize. *New Phytol.*, 83:615-622.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B. & KLEIN, E. 1989 - Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat roots by immuno-gold labeling. *Plant Soil*, 117:207-218.

- LIN, W.; OKON, Y. & HARDY, R. W. F. 1983 - Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:1775-1779.
- LOBLER, M. & KLAMBT, D. 1985 - Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). I - Purification by immunological methods and characterization. *J. Biol. Chem.*, 260:9848-9853.
- LOW, P. S.; LLOYD, D. H.; STEIN, T. M. & ROGERS III, J. A. 1979 - Calcium displacement by local anesthetics. Dependence on pH and anesthetic charge. *J. Biol. Chem.*, 254:4119-4125.
- LUKACOVIC, M. F.; VERKMAN, A. S.; DIX, J. A. & SOLOMON, A. K. 1984 - Specific interaction of the water transport inhibitor, pCMBS, with band 3 in red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 778:253-259.
- MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. & PEDROSA, F. 1991 - Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. *Can. J. Microbiol.*, 37:549-553.
- MACKLON, A. E. S. 1984 - Calcium fluxes at plasmalemma and tonoplast. *Plant Cell Environ.*, 7:403-407.
- MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M. & COSGROVE, D. J. 1992 - Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4:1425-1433.
- MARSCHNER, H. & ROMHELD, V. 1983 - In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: Effect of plant species and nitrogen source. *Z. Pflanzenphysiol.*, 111:241-251.
- MARSCHNER, H.; ROMHEL, V. & OSSENBERG-NEUHAUS, H. 1982 - Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. *Z. Pflanzenphysiol.*, 105:407-416.
- MASUDA, Y. 1978 - Auxin-induced cell wall loosening. *Bot. Mag.*, 1:103-123.

- MASUDA, Y. 1990 - Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. *Bot. Mag.*, **103**:345-370.
- MARTINOIA, E.; LOCHER, R. & VOGT, E. 1993 - Inositol triphosphate metabolism in subcellular fractions of barley (*Hordeum vulgare* L.) mesophyll cells. *Plant Physiol.*, **102**:101-105.
- MELIN, P.-M.; SOMMARIN, M.; SANDELIUS, A. S. & JERGIL, B. 1987 - Identification of Ca²⁺-stimulated polyphosphoinositide phospholipase C in isolated plant plasma membranes. *FEBS Lett.*, **223**:78-91.
- MELIN, P.-M.; PICAL, C.; JERGIL, B. & SOMMARIN, M. 1992 - Polyphosphoinositide phospholipase C in wheat root plasma membranes. Partial purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1123**:163-169.
- MERTENS, I. & HESS, D. 1984 - Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. *Plant Soil*, **82**:87-89.
- MICHIELS, K. W.; VANDERLEYDEN, J. & VAN GOOL, A. 1989 - *Azospirillum*-plant root association: a review. *Biol. Fertil. Soils*, **8**:356-368.
- MICHIELS, K. W.; CROES, C. L. & VANDERLEYDEN, J. 1991 - Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, **137**:2241-2246.
- MILLET, E.; AVIVI, Y. & FELDMAN, M. 1985 - Effects of rhizospheric bacteria on wheat yield under field conditions. *Plant Soil*, **86**:347-355.
- MORSE, M. J.; SATTER, R. L.; CRAIN, R. C. & COTÉ, G. G. 1989 - Signal transduction and phosphatidylinositol turnover in plants. *Physiol. Plant.*, **76**:118-121.
- MURTY, M. G. & LADHA, J. K. 1987 - Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Fertil. Soils*, **4**:3-7.

- MURRAY, F.; WILSON, S. & MONK, R. 1992 - NO₂ and SO₂ mixtures stimulate barley grain production but depress clover growth. *Environ. Exp. Bot.*, 32:185-192.
- NAGAHASHI, G.; TU, S.-I.; FLEET, G. & NAMGOONG, S. K. 1990 - Inhibition of cell wall-associated enzymes in vitro and in vivo with sugar analogs. *Plant Physiol.*, 92:413-418.
- NELSON, L. M. & KNOWLES, R. 1978 - Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. *Can. J. Microbiol.*, 24:1395-1403.
- NEUER, G. KRONENBERG, A. & BOTHE, H. 1985 - Denitrification and nitrogen fixation by *Azospirillum*. III - Properties of a wheat-*Azospirillum* association. *Arch. Microbiol.*, 141:364-370.
- NEYRA, C. A. & DOBEREINER, J. 1979 - Nitrogen fixation in grasses. *Adv. Agron.*, 29:1-38.
- NEYRA, C. A.; DOBEREINER, J. ; LALAND, R. & KNOWLES, R. 1977 - Denitrification by N₂-fixin *Spirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.*, 23:300-305.
- NICHOLAS, D. J. D. & NASON, A. 1957 - Determination of nitrate and nitrite. *Methods Enzymol.*, 3:981-984.
- OKON, Y. 1985 - *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.*, 3:223-229.
- OKON, Y. & KAPULNIK, Y. 1986 - Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil*, 90:3-16.
- OKON, Y. & ITZIGSOHN, R. 1992 - Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Rev.*, 103:131-140.
- OLBE, M. & SOMMARIN, M. 1991 - ATP-dependent Ca²⁺ transport in wheat root plasma membrane vesicles. *Physiol. Plant.*, 83:535-543.

- O'NEILL, R. A. & SCOTT, T. K. 1983 - Proton flux and elongation in primary roots of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.*, 73:199-201.
- PACOVSKY, R. S. 1990 - Development and growth effects in the *Sorghum Azospirillum* association. *J. Appl. Bacteriol.*, 68:555-563.
- PACOVSKY, R. S.; PAUL, E. A. & BETHLENFALVAY, G. J. 1985 - Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil*, 85:145-148.
- PATRIQUIN, D. C. & DOBEREINER, J. 1978 - Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brasil. *Can. J. Microbiol.*, 24:734-742.
- PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J. & JAIN, D. K. 1983 - Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.*, 29:900-915.
- PÁVÓ, I. & FAHRENHOLZ, F. 1990 - Differential inactivation of vasopressin receptor subtypes in isolated membranes and intact cells by N-ethylmaleimide. *FEBS Lett.*, 272:205-208.
- PENOT, I.; BERGES, N.; GUNGUENE, C & FAGES, J. 1992 - Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays*) in France, using biochemical tests and plasmid profiles. *Can. J. Microbiol.*, 38:798-803.
- PINHEIRO, R. O. 1992 - Estudo da adesão de *Azospirillum* spp às raízes de trigo. Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- PITMAN, M. G.; SCHAEFER, N. & WILDES, R. A. 1975 - Stimulation of H⁺ efflux and cation uptake by fusicoccin in barley roots. *Plant Sci. Lett.*, 4:323-329.
- PRATZ, J.; RIPOCHE, P. & CORMAN, B. 1986 - Evidence for proteic water pathways in the luminal membrane of kidney proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta*, 856:259-266.

- RAGHOTHAMA, K. G.; MIZRAHI, Y. & POOVAIAH, B. W. 1985 - Effect of calmodulin antagonists on auxin-induced elongation. *Plant Physiol.*, 79:28-33.
- RAYLE, D. L. & CLELAND, R. E. 1992 - The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.*, 99:1271-1274.
- REINER, O. & OKON, Y. 1986 - Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.*, 32:829-834.
- REINHOLD, B.; HUREK, T. & FENDRIK, I. 1985 - Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.*, 162:190-195.
- REINHOLD, B.; HUREK, T. & FENDRIK, I. 1989 - Plant-bacteria interactions with special emphasis on the kallar grass association. In: F. A. Skinner; R. M. Boddey & I. Fendrik (eds). Nitrogen fixation with non-legumes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp.199-207.
- RENGEL, Z. 1992 - Disturbance of cell Ca^{2+} homeostasis as a primary trigger of Al toxicity syndrome. *Plant Cell Environ.*, 15:931-938.
- REYNDERS, L. & VLASSAK, K. 1982 - Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant Soil*, 66:217-273.
- ROMHELD, V.; MULLER, C. & MARSCHNER, H. 1984 - Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol.*, 76:603-606.
- SADASIVAN, L .A. & NEYRA, C. A. 1985 - Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.*, 163:716-723.
- SADASIVAN, L .A. & NEYRA, C. A. 1987 - Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 21145. *J. Bacteriol.*, 169:1670-1677.

- SAHA, K. C.; SANNIGRAHI, S. & MANDAL, L. N. 1985 - Effect of inoculation of *Azospirillum lipoferum* on nitrogen fixation in rhizosphere soil, their association with roots, yield and nitrogen uptake by mustard (*Brassica juncea*). *Plant Soil*, 87:273-280.
- SANTONI, V.; VANSUY, G. & ROSSIGNOL, M. 1990 - Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane H⁺-ATPase from tobacco leaves. *Plant Sci.*, 68:33-38.
- SARIG, S.; KAPULNIK, Y. & OKON, Y. 1985 - Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant Soil*, 90:335-342.
- SARIG, S.; BLUM, A. & OKON, Y. 1988 - Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Agric. Sci.*, 110:271-277.
- SCHUMAKER, K. S. & SZE, H. 1985 - A Ca²⁺/H⁺ antiport system driven by the proton electrochemical gradient of a tonoplast H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol.*, 79:1111-1117.
- SIDDIQI, M. Y.; KING, B. J. & GLASS, A. D. M. 1992 - Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity. *Plant Physiol.*, 100:644-650.
- SMITH, F. M. & VERPOORTE, J. A. 1970 - Mg²⁺-activated ATP hydrolysis and sulfhydryl groups in membranes from human erythrocytes. *Can. J. Biochem.*, 48:604-612.
- SPANSWICK, R. M. 1981 - Electrogenic ion effluxes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32:267-289.
- STANCHEVA, I.; DIMITROV, I.; KALOYANOVA, N.; DIMITROVA, A. & ANGELOV, M. 1992 - Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in maize. *Agronomie*, 12:319-324.

- TAKISHIMA, K.; SHIMIZU, H.; SETAKA, M. & KWAN, T. 1980 - A spin-label study of the effects of drugs on calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biochem.*, 87:305-312.
- TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R. & DOBEREINER, J. 1978 - A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum brasilense* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24:967-980.
- TCHAN, Y. T.; ZEMAN, A. M. M. & KENNEDY, I. R. 1991 - Nitrogen fixation in paronodules of wheat roots by introduced free-living diazotrophs. *Plant Soil*, 137:43-47.
- THEOLOGIS, A. 1986 - Rapid gene regulation by auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37:407-438.
- TIEN, T. M.; GASKINS, M. H. & HUBBELL, D. H. 1979 - Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:1016-1024.
- TIEN, T. M.; DIEM, H. G.; GASKINS, M. H. & HUBBELL, D. H. 1981 - Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.*, 27:426-431.
- TOMPKINS, G. A.; JACKSON, W. A. & VOLK, R. J. 1978 - Accelerated nitrate uptake in wheat seedlings: effects of ammonium and nitrite pretreatments and of 6-methylpurine and puromycin. *Physiol. Plant.*, 43:166-171.
- UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H. & DAZZO, F. B. 1980 - Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:219-226.
- VANCURA, V. 1964 - Root exudates of plants. I. Analysis in their initial phases of growth. *Plant Soil*, 21:231-248.

- VENIS, M. A. & NAPIER, R. M. 1991 - Auxin receptors: recent developments. *Plant Growth Reg.*, 10:329-340.
- WOLNIAK, S. M.; HEPLER, P.K. & JACKSON, W. T. 1980 - Detection of the membrane-calcium distribution during mitosis in *Haemanthus* endosperm with chlorotetracycline. *J. Cell Biol.*,87:23-32.
- YAHALOM, E.; KAPULNIK, Y. & OKON, Y. 1984 - Response of *Setaria italica* to inoculation with *Azospirillum brasilense* as compared to *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil*, 82:77-85.
- YAHALOM, E.; OKON, Y. & DOVRAT, A. 1990 - Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). *Can. J. Microbiol.*, 36:10-14.
- ZIMMER, W. & BOTHE, H. 1988 - The phyto-hormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant Soil*, 110:239-247.
- ZIMMER, W.; ROEBEN, K. & BOTHE, H. 1988 - An alternative explanation for growth promotion by bacteria of genus *Azospirillum*. *Planta*, 176:333-342.

APÊNDICE

Meios de crescimento para as bactérias

1 - Meio NFb (DOBEREINER, 1980).

5 g ácido málico; 5 ml de K_2HPO_4 solução 10%; 2 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ solução 10%; 1 ml de NaCl solução 10%; 2 ml de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solução 1%; 2 ml de solução de micronutrientes para meio de cultura; 4 ml de FeEDTA solução 1,64%; 4.5 g de KOH; 1 ml de vitamina para meio de cultura. Completar o volume para 1000 ml com água deionizada e corrigir o pH para 6.8 - 7.0 com KOH.

2 - Solução de micronutrientes para meio de cultura

0.2 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0.235 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0.28 g de H_3BO_3 ; 0.008 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,024 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Dissolver em sequência e completar o volume para 200 ml com água deionizada. Conservar refrigerado a 4°C.

3 - Solução de vitamina para meio de cultura

10 mg de biotina; 20 mg de piridoxina. Dissolver em banho- maria e completar o volume para 100 ml com água deionizada.

4 - Solução de FeEDTA 1.64%

16 g Na_2EDTA (tritriplex III); 11.95 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Dissolver separadamente e completar o volume para 1000 ml com água deionizada

5 - Meio NFb semi-sólido

Ao meio NFb, acrescentar 1.6 g/l de agar, e 2 ml de azul de bromotimol 0.5% em 0.2 N de KOH.

6 - Meio NFb sólido

Ao meio NFb, acrescentar 15 g/l de agar, 1 g NH_4Cl e 20 mg de extrato de levedura.

7 - Meio NFb + NH_4^+ e/ou NO_3^-

Ao meio NFb acrescentar 1 g/l de NH_4Cl e/ou 2 g/l de KNO_3 .

8 - "Meio batata" sólido.

200 g de batata; 2.5 g de ácido málico; 2 gotas de azul de bromotimol solução 0.5% em 0.2 N de KOH; 2.5 g de açúcar cristal; 2 ml de solução de micronutrientes para meio de cultura; 15 g de agar.

Procedimento: Pesar 200 g de batata, lavar bem, cortar, colocar para ferver durante 30 minutos em 500 ml de água deionizada e filtrar com algodão. Separadamente, dissolver o ácido málico em 50 ml de água deionizada com 2 gotas de azul de bromotimol solução alcoólica a 0.5%, ajustar o pH para 6.5 - 6.8 com KOH e acrescentar o açúcar cristal e a solução de micronutrientes. Adicionar ao filtrado os 50 ml da solução acima e a vitamina, e completar o volume para 1000 ml com água deionizada.