

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/9946**  
**IB/80669**

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*1988*

CARACTERIZAÇÃO DE *Azospicillum brasilense* E *Azospicillum lipoferum*  
ISOLADAS DE TEOSINTE E MILHO E SUA INTERAÇÃO COM RAÍZES DE MILHO.

*Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida  
pela candidata Janie Mendes Jasmim e aprovada  
pela comissão julgadora. Arruda*

JANIE MENDES JASMIM

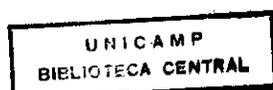


Orientador: Prof. Dr. Paulo Arruda

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

CAMPINAS

1988



CLASSIF.	J
AUTOR.	J311c
V.	EX
TOMBO BC/	9946
1B/	825

1B/ 80669  
24 9946

À minha família,

dedico.

"Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena.  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus ao mar o perigo e o abysmo deu,  
Mas nelle é que espelhou o céu."

(Fernando Pessoa)

## AGRADECIMENTOS

Várias pessoas colaboraram para a concretização desse trabalho.

A elas deixo meu humilde e sincero agradecimento:

- Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, pelo uso do laboratório e orientação;
- À Dra. Johanna Dobereiner pelo treinamento de iniciação científica;
- Ao Prof. Dr. Alan Crozier, pelo auxílio e orientação nos experimentos envolvendo as análises realizadas, por seu intermédio, nas universidades estrangeiras;
- Ao Prof. Dr. Willian José da Silva, pelas sementes utilizadas nos experimentos;
- Ao Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena, pela orientação na análise estatística, leitura da tese, amizade e confiança;
- Ao Dr. Brasília S. de Oliveira Jr., pelas preciosas sugestões;
- À Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato, pelos conselhos e pelo estí-

mulo;

- À Profa. Dra. Ana Maria Monteiro, pela cooperação junto ao Dr. Crozier e sugestões na redação relativa aos experimentos com HPLC;
- À Elisabeth Ribas Bilo, pelo auxílio na instalação e coleta de dados de alguns experimentos;
- À Márcia, Therezinha e Izabel, pelo apoio e compreensão;
- À Geni, Luciane, Rose, Dr. Gabriel, Da. Aparecida e Da. Geraldina pelo estímulo;
- À Elaine Corrêa Janeiro, pelo empenho e coleguismo demonstrados no auxílio que prestou para a composição das figuras;
- Aos meus colegas de trabalho pelo interesse e entusiasmo;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro concedido;
- Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética e Evolução e do Instituto de Biologia, como um todo, pelos serviços prestados durante os anos de convivência;

- Ao Departamento de Computação e ao Depto. de Biologia Celular pelo uso do microcomputador;
- À Cristina Cavallaro e Monique Fonseca pelas opiniões;
- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo e ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek pelas sugestões;
- Ao Carlo, pela confiança inabalável e carinho;
- À minha mãe e irmãos, pela confiança e estímulo incansáveis;
- A todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho;
- A Deus.

## ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	01
2- OBJETIVOS.....	03
3-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	
3-1- Taxonomia de <i>Azospirillum</i> .....	01
3-2- Colonização das raízes por <i>Azospirillum</i> .....	05
3-3- Aspectos Fisiológicos da Interação Planta-bactéria.....	08
3-4- Aspectos Genéticos Envolvidos na Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas.....	10
4- MATERIAIS E MÉTODOS	
4-1- Isolamento e Identificação das Estirpes de <i>Azospirillum</i> .	
4-1-1- Material Vegetal.....	15
4-1-2- Meios de Cultura.....	16
4-1-2-1- Meio NFb Semi-sólido.....	16
4-1-2-2- Meio Batata Sólido (BMS).....	16
4-1-2-3- Solução de Micronutrientes para NFb.....	17
4-1-2-4- Solução de Vitaminas para NFb.....	17
4-1-2-5- Solução Salina para Diluição.....	18

4-1-3-	Cultura de Enriquecimento e Estimativa da Atividade da Nitrogenase através da Redução de Acetileno (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ).....	18
4-1-4-	Contagem do Número de <i>Azospirillum</i> .....	19
4-1-5-	Purificação e Identificação das Espécies de <i>Azospirillum</i> ..	20
4-2-	Caracterização das Estirpes de <i>Azospirillum</i> Isoladas de Teosinte e de Milho.	
4-2-1-	Resistência a Antibióticos.....	21
4-2-1-1-	Meios de Cultura.....	21
4-2-1-2-	Condições de Avaliação.....	22
4-2-2-	Produção de Ácido Indol-acético (AIA).....	23
4-2-2-1-	Método do Reagente de Ehrlich.....	23
4-2-2-2-	Método do Reagente de Kovács.....	24
4-2-2-3-	Método do Reagente de Salkowski.....	24
4-3-	Avaliação da Produção de Ácido Indol-acético (AIA) pela Estirpe 703 Ebc de <i>A. brasilense</i> .	
4-3-1-	Reação Colorimétrica com o Reagente de Salkowski.....	25
4-3-1-1-	Efeito de diferentes concentrações de triptofano e cloreto de amônio na produção de AIA.....	25
4-3-1-2-	Efeito do tempo de incubação e da concentração de triptofano na produção de AIA.....	26
4-3-1-3-	Produção de AIA da Estirpes de <i>Azospirillum</i> .....	27
4-4-	Quantificação e Metabolismo do AIA, em Culturas de <i>Azospirillum</i> <i>brasilense</i> , por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).	
4-4-1-	Quantificação e metabolismo do AIA endógeno produzido pela	

estirpe 703 Ebc de <i>Azospirillum</i> .....	28
4-4-1-1- Análise qualitativa por HPLC e MS de indóis produzidos por <i>Azospirillum</i> .....	28
4-4-1-2- Quantificação do AIA, pelo Método da Diluição Isotópica, de Culturas de <i>Azospirillum</i> .....	30
4-4-1-3- Metabolismo do AIA em <i>Azospirillum brasilense</i> .....	31
4-4-2- Análise do AIA endógeno e seu metabolismo em raízes de milho inoculadas e não inoculadas com <i>Azospirillum</i> .	
4-4-2-1- Material Vegetal.....	32
4-4-2-2- Material Bacteriano.....	32
4-4-2-3- Meio de Crescimento das Plântulas.....	32
4-4-2-4- Preparo do Inóculo.....	33
4-4-2-5- Germinação e Crescimento das Plântulas.....	33
4-4-2-6- Análise do Metabolismo do AIA das Raízes de Milho por HPLC.....	34
4-5- Efeito da Adição de Diferentes Nutrientes ao Meio de Cultura para Crescimento de <i>Azospirillum</i> .	
4-5-1- Método da Placa Gradiente.....	35
4-5-2- Método da Placa com Orifício.....	36
4-5-3- Método da Curva de Crescimento em Meio Líquido.....	38
4-6- Efeito da Adição de Diferentes Extratos de Raízes no Crescimento de <i>Azospirillum</i> .	
4-6-1- Material Vegetal.....	39
4-6-2- Preparação dos Extratos de Raízes.....	40
4-6-3- Material Bacteriano e Efeito dos Extratos de Raízes.....	40

4-7-	Efeito da Inoculação de Diferentes Genótipos de Milho com Diferentes Estirpes de <i>Azospirillum</i> , em Solução Nutritiva.	
4-7-1-	Material Vegetal.....	41
4-7-2-	Preparo do Inoculante.....	42
4-7-3-	Efeito da Adição de Diferentes Concentrações de Inoculantes no Crescimento das Raízes de Milho.....	42
4-7-4-	Efeito da Adição de Diferentes Concentrações de Triptofano no Crescimento das Raízes de Milho, em Solução Nutritiva..	43
4-7-5-	Efeito da Adição de Diferentes Concentrações de AIA no Crescimento de Raízes de Milho, em Solução Nutritiva.....	43
4-7-6-	Efeito da Adição de AIA, Triptofano, Tirosina e Fenilalanina no Crescimento das Rízes de Milho, em Solução Nutritiva...	44

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5-1-	Isolamento e Identificação das Estirpes de <i>Azospirillum</i> presentes em raízes de Teosinte e Milho.....	45
5-1-1-	Estimativa da Atividade da Nitrogenase, pela Redução de $C_2H_2$ , e Contagem do Número de <i>Azospirillum</i> spp.....	45
5-1-2	Purificação e Identificação das Estirpes de <i>Azospirillum</i> ...	48
5-2-	Caracterização das Estirpes de <i>Azospirillum</i> Isoladas de Teosinte e de Milho.	
5-2-1-	Resistência a Antibióticos.....	49
5-2-2-	Produção de Ácido Indol-acético (AIA).....	60

5-2-2-1-	Ensaio Preliminares.....	60
5-2-2-2-	Efeito de diferentes concentrações de triptofano e cloreto de amônio na produção de AIA.....	62
5-2-2-3-	Efeito do tempo de incubação e da concentração de triptofano na produção de AIA.....	66
5-2-2-4-	Avaliação da produção de AIA pelas estirpes de <i>Azospicillum</i> .....	70
5-3-	Quantificação e Metabolismo do AIA por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).	
5-3-1-	Análise qualitativa dos indóis produzidos por <i>Azospicillum</i> utilizando-se HPLC e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).....	72
5-3-2-	Análise do AIA de cultura de <i>Azospicillum</i> usando o método de diluição isotópica.....	73
5-3-3-	Metabolismo do AIA de raízes de milho inoculadas e não inoculadas com <i>Azospicillum</i> .....	80
5-4-	Efeito da adição de diferentes nutrientes ao meio de cultura para o crescimento de <i>Azospicillum</i> .	
5-4-1-	Método da Placa Gradiente.....	82
5-4-2-	Método da Placa com Orifício.....	82
5-4-3-	Método da Curva de Crescimento em Meio Líquido.....	83
5-5-	Efeito da adição de diferentes extratos vegetais no crescimento de <i>Azospicillum</i> .....	95

5-6-	Efeito da inoculação de diferentes genótipos de milho com diferentes estirpes de <i>Azospicillum</i> .	
5-6-1-	Efeito de diferentes concentrações de inoculante no crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva.....	99
5-6-2-	Efeito de diferentes concentrações de triptofano no crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva.....	112
5-6-3-	Efeito de diferentes concentrações de ácido indol-acético (AIA) no crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva.....	114
5-6-4-	Efeito da adição de AIA, triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) no crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva.....	116
6-	CONCLUSÕES.....	124
7-	RESUMO.....	128
8-	SUMMARY.....	130
9-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

## 1- INTRODUÇÃO

Na maior parte das áreas agrícolas, a produtividade está limitada pela disponibilidade de nutrientes para a planta, destacando-se o nitrogênio. O aumento da produção de culturas como trigo, milho, cevada e outras, depende da adição ao solo de grandes quantidades de fertilizantes, em especial dos nitrogenados. Para atender à demanda cada vez maior de produção de grãos, a aplicação dos fertilizantes à base de nitrogênio aumentou exponencialmente nos últimos anos (MERRICK & DIXON, 1984). Com a elevação dos preços dos fertilizantes devido à crise de energia, houve um aumento considerável do custo da produção agrícola. Assim, em países como o Brasil, o uso de fertilizantes químicos, sobretudo dos nitrogenados, tornou-se proibitivo. Consequentemente, os índices de produtividade são mais baixos do que os alcançados por países desenvolvidos que chegam a aplicar até 150 kg de nitrogênio por hectare (OKON, 1985).

Uma alternativa para a diminuição dos gastos com o uso dos fertilizantes nitrogenados é a exploração da fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é encontrada em um número limitado de organismos procariotos, dentre os quais poucos são utilizados na agricultura. Podemos citar, dentre estes, as bactérias do gênero *Rhizobium* que vivem em simbiose com raízes de leguminosas, e as cianobactérias que são usadas diretamente como adubação verde, ou em simbiose, em culturas de arroz (MERRICK & DIXON, 1984).

A simbiose *Rhizobium*-leguminosas parece ser a mais perfeita. Nesse sistema observa-se a presença de nódulos, com estruturas especializadas, que são o sítio da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>). As bactérias são envolvidas por uma membrana dentro da qual há leghemoglobina que é responsável pelo rápido transporte de oxigênio para fora do sítio de fixação do N<sub>2</sub>, mantendo, assim, uma baixa concentração de oxigênio em solução. Este é um fator bastante importante, uma vez que o complexo enzimático da nitrogenase, responsável pela fixação do nitrogênio, é muito sensível à presença de altas concentrações de oxigênio, podendo ser inativado (DOBEREINER, 1977; YATES, 1980).

As bactérias do gênero *Azospirillum* que apresentam associação com plantas da família Gramineae (DOBEREINER et al., 1976; MAGALHÃES et al., 1979) têm sido consideradas como um grupo de organismos bastante promissor para uso na agricultura, em função da sua capacidade de colonizar efetivamente as raízes e exercer efeitos benéficos nas plantas (OKON, 1985). Entretanto, essa associação difere em alguns aspectos da simbiose de *Rhizobium* com as raízes de leguminosas. Essas diferenças tornam a fixação biológica de nitrogênio nessas plantas mais variável e dependente de fatores ambientais e climáticos, dificultando a avaliação da contribuição real desses sistemas e limitando sua exploração na agricultura (BALDANI, 1980).

A identificação dos fatores envolvidos na associação planta-bactéria, sob condições de campo e em laboratório, é essencial para o estabelecimento de práticas agronômicas que favoreçam a associação com

gramíneas.

## 2-- OBJETIVOS

Considerando os aspectos acima abordados e tendo como base o papel de relevância ocupado pela cultura do milho em nosso País, o presente trabalho tem como objetivos:

- 2.1- O isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* de raízes de teosinte e milho cultivados sob condições de campo.
- 2.2- A Identificação e caracterização das culturas de *Azospirillum* com base em suas características bioquímicas e fisiológicas.
- 2.3- A utilização das estirpes de *Azospirillum* caracterizadas, para a determinação de uma metodologia que permita a discriminação de genótipos de milho quanto à associação com as bactérias fixadoras de nitrogênio.

### 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1- Taxonomia de *Azospirillum*.

Inicialmente descrita por BEIJERINCK (1925) como *Spirillum lipoferrum*, constatou-se num estudo mais detalhado com 61 linhagens dessa espécie que, na realidade, existiam duas espécies pertencentes a um novo gênero. Quando crescidas em meio com peptona-succinato, essas linhagens apresentavam morfologia semelhante: células vibróides com diâmetro de 1,0  $\mu$ m. Em meio líquido apresentavam um único flagelo polar, mas quando crescidas em ágar, a 30<sup>o</sup>C, também observava-se a presença de flagelos laterais. Experimentos de homologia do DNA indicaram a existência de dois grupos homólogos distintos, porém relacionados: 46 estirpes estavam no Grupo I e 15 pertenciam ao Grupo II. As estirpes do Grupo II eram capazes de crescer em meio sem nitrogênio mineral, cuja fonte de carbono disponível era a glucose. Requeriam biotina, produziam uma reação ácida em meio com peptona e glucose, e formavam células mais largas e longas, em forma de S ou hélice, em meio semi-sólido sem nitrogênio com malato. Os grupos I e II foram descritos com base em suas características, como duas espécies pertencentes ao gênero *Azospirillum*. As estirpes pertencentes ao Grupo II foram chamadas de *Azospirillum lipoferrum* e aquelas do Grupo I foram denominadas *Azospirillum brasilense* (TARRAND et al., 1978).

Recentemente um nova espécie de *Azospirillum* foi descrita, tendo sido isolada de várias gramíneas, de uma palmácea (*Bactris gasipaes*), e de outras plantas, na Amazônia e no Estado do Rio de Janeiro (MAGALHÃES, 1983; SOUTO, 1982). A nova espécie, conhecida como *Azospirillum amazouense* assemelha-se a *A. lipoferum* e a *A. brasilense* pela forma (bastonete curvo), movimento ondulatório típico e formação de película em meio semi-sólido sem suplementação de nitrogênio. As principais diferenças entre esta espécie e as outras duas são: intolerância ao meio alcalino - o crescimento dependente de N<sub>2</sub> é inibido em pH 7,0; o diâmetro menor - 0,8; uma menor tolerância ao oxigênio molecular; utiliza sacarose que permite seu crescimento dependente de N<sub>2</sub> em pH 6,0 com muito pouca variação, superando o problema de alcalinização que é observado com o uso de malato (MAGALHÃES et al., 1983; MAGALHÃES & DOBEREINER, 1984).

### 3.2- Colonização das raízes por *Azospirillum*.

*Azospirillum* é uma bactéria que ocorre livremente na maioria dos solos tropicais, principalmente nos solos sob cultura de gramíneas (DOBEREINER et al., 1976; LAKSHMI-KUMARI et al., 1976) mas ocorre também em solos de regiões temperadas (REYNDERS & VLASSAK, 1976; SLOGER & OWENS, 1976; DE KONINCK et al., 1987).

Através de observações em microscópio ótico, de tecidos de en-

dorrizosfera de milho e de gramíneas forrageiras, foi constatada a presença de *A. lipoferrum* e *A. brasilense* nos espaços intercelulares de córtex e endoderme, nas células de xilema e inter e intracelularmente na medula (PATRIQUIN & DOBEREINER, 1978). Em milho crescido sob condições de campo, foi observada infecção abundante no cilindro central das raízes, estendendo-se aos vasos do xilema e regiões nodais do colmo sugerindo que a infecção da raiz estende-se para o colmo (MAGALHÃES et al., 1979).

Estudos com trigo, arroz e gramíneas forrageiras mostraram resultados semelhantes com a presença de *Azospirillum* nos espaços inter e intra-celulares (DOBEREINER & DAY, 1976; SUBBA RAO, 1977; OKON & KAPULNIK, 1986; BALDANI et al., 1986).

Resultados de ensaios feitos com progênies do cruzamento entre *Zea mays* (milho) e *Zea mexicana* (teosinte), mostraram a presença de organismos fixadores de nitrogênio na semente e em diferentes partes da planta (RUSCHEL et al., 1979). A presença de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> foi também detectada em nós do colmo de *Zea diploperennis* (teosinte), indicando a potencialidade da planta para a associação (ZABOROWSKY et al., 1980).

BALDANI & DOBEREINER (1979) mostraram a existência de uma certa especificidade hospedeira na infecção de raízes de gramíneas por *A. lipoferrum* e *A. brasilense*. Em todos os experimentos, *A. lipoferrum* era mais frequentemente isolado de raízes de milho esterilizadas superficialmente, enquanto que *A. brasilense* foi mais encontrado em raízes de

trigo e arroz.

Experimentos de inoculação de milho com estirpes de *Â. brasiliense* e *Â. liopferum* resistentes à estreptomicina, demonstraram que *Â. liopferum* era a espécie predominantemente encontrada nas raízes de milho e que *Â. brasiliense* não apresentava um bom estabelecimento nas raízes desta planta. Esse resultado foi observado mesmo quando as estirpes de *Â. brasiliense* apresentavam resistência à estreptomocina indicando, portanto que a especificidade de infecção não estava ligada à resistência ao antibiótico (DOBEREINER & BALDANI, 1979).

Da mesma forma, o isolamento de *Azospicillum* a partir de raízes de gramíneas de clima temperado, com via fotossintética C3 (trigo, aveia, centeio e cevada) levou à obtenção, predominantemente, de bactérias da espécie *Â. brasiliense*, enquanto que *Â. liopferum* foi isolada, preferencialmente, de gramíneas tropicais com via fotossintética C4. A única exceção foi a cana-de-açúcar que apresentou comportamento igual ao dos cereais temperados. Por outro lado, a tiririca (Cyperaceae) comportou-se como as gramíneas com via C4 (BALDANI et al., 1981).

*Azospicillum amazonense* também tem sido encontrada infectando a endorrizosfera de gramíneas e ciperáceas juntamente com *Â. liopferum* e *Â. brasiliense*. Contagens comparativas mostraram que *Â. amazonense* ocorre em números mais altos do que as espécies conhecidas de *Azospicillum* e *Beijerinckia*, em raízes de pupunha (*Bactris gasipaes*) e de *Brachiaria humidicola* (MAGALHÃES & DOBEREINER, 1984).

### 3.3- Aspectos Fisiológicos da Interação Planta-bactéria.

Experimentos de inoculação com *Azospirillum* sob diferentes condições ambientais, têm demonstrado um aumento no peso seco, produção de grãos e de massa verde, e no conteúdo de N da planta (HEGAZI et al., 1983; KAPULNIK et al., 1983; BALDANI et al., 1983; BODDEY et al., 1986). Também têm sido observados efeitos benéficos na taxa de absorção de fósforo pelas plantas inoculadas com essa bactéria, além de efeito sinérgico com micorrizas (SUBBA RAD et al., 1985; ISHAC et al., 1986).

Dados recentes demonstram que a inoculação de leguminosas de clima frio, como *Pisum sativum* L., *Vicia sativa* L., e outras, com *Azospirillum*, aumentou significativamente a produção de grãos, matéria seca, nitrogênio total e atividade de redução de acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>). Foi também verificada uma nodulação mais eficiente quando *Azospirillum* e *Rhizobium* eram aplicadas conjuntamente, em comparação com os controles inoculados apenas com *Rhizobium* (SARIG et al., 1986). Esses efeitos estimulantes causados por *Azospirillum* parecem estar relacionados com a produção pela bactéria de substâncias reguladoras do crescimento (TIEN et al., 1979; UMALI-GARCIA et al., 1980; OKON, 1985).

A produção de substâncias reguladoras do crescimento vegetal por *Azospirillum*, sobretudo a produção do ácido indol-acético (AIA) e seu

efeito no desenvolvimento do sistema radicular e crescimento das plantas inoculadas, têm sido reportados em vários trabalhos. Ácido indolacético, ácido indol-láctico, giberelina e substâncias semelhantes a citocininas foram encontradas em sobrenadantes de culturas líquidas de *A. brasilense* (REYNDERS & VLASSAK, 1979; TIEN et al., 1979; DE FRANCESCO et al., 1985; HOREMANS & VLASSAK, 1985; HOREMANS et al., 1986). A análise de sobrenadantes de culturas de *A. liqiferum* também levou à detecção da produção de auxina (AIA) por essa espécie (HARTMANN et al., 1983).

Mudanças na morfologia e crescimento de raízes de *Pennisetum purpureum*, *Beta vulgaris* e trigo, devidas ao efeito de substâncias de crescimento produzidas por *Azospirillum* foram reportadas em experimentos de inoculação sob condições controladas. O aumento e ramificação de pêlos radiculares, aumento do número de raízes laterais, e alongação da raiz (para *Beta vulgaris*) foram alguns dos efeitos observados (TIEN et al., 1979; JAIN & PATRIQUIN, 1985; KOLB & MARTIN, 1985).

Um outro ponto a ser elucidado na associação planta-bactéria é o mecanismo de ação de substâncias que sirvam como atrativos para o estabelecimento da interação.

Em estudos de quimiotaxia utilizando *Azospirillum brasilense* observou-se uma resposta positiva a aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos. A bactéria respondeu quimiotaxicamente a malato de sódio, succinato de sódio, arabinose, galactose, glutamato de sódio e aspartato de sódio, na concentração de 1 mM, em placas de petri contendo agar-á-

gua. Também foi observado um efeito atrativo causado por glicina, ácido glutâmico, arabinose, galactose, succinato e malato, na concentração de 10 mM. Porém, piruvato e lactato, que são considerados como fontes de carbono para *A. brasilense*, não funcionaram como boas substâncias atrativas. Além disso, não foi observado efeito atrativo para 1 mM de glucose ou frutose. Sacarose, arabinose, frutose, glucose e outros açúcares mostraram efeito quimiotático também para *A. liopferum*. Os aminoácidos, glutamina, serina e asparagina foram igualmente eficientes, sendo a glutamina de efeito mais acentuado que os outros dois (BARAK et al., 1983; HEINRICH & HESS, 1984).

Exsudatos de raízes de *Pennisetum americanum* mostraram um efeito estimulante no crescimento de *Azospicillum brasilense*. Análises desses exsudatos por cromatografia de camada delgada (TLC) revelaram a presença de vários ácidos orgânicos como o málico, succínico e cítrico, bem como de aminoácidos e açúcares (RAD & VENKATESWARLU, 1985).

#### 3.4- Aspectos Genéticos Envolvidos na Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas.

O sucesso na obtenção de linhagens selecionadas de plantas que tenham uma melhor habilidade para a associação com bactérias fixadoras de nitrogênio e o benefício que isso trará, depende da acuracidade das medidas tomadas. Sem uma técnica que distinga a taxa de fixação de N<sub>2</sub> de outros processos, a seleção de variedades de plantas melhoradas para esse fim é dificultada. Nenhum método confiável, para medir a taxa

de fixação de nitrogênio em gramíneas, visando a seleção de genótipos mais adequados foi ainda aplicada (BERKUM & BOHLOOL, 1980).

Estudos realizados com *Paspalum notatum* mostraram que a bactéria fixadora de N<sub>2</sub>, *Azotobacter paspali*, associa-se especificamente com 5 (cinco) ecótipos tetraplóides. Dentre os 33 (trinta e três) ecótipos de *P. notatum* analisados, somente esses cinco estimularam o crescimento da bactéria em sua rizosfera (DOBEREINER, 1966; DOBEREINER, 1970). Esses resultados são significativos pois suas conclusões foram baseadas na habilidade das plantas em promover o crescimento específico de *Azotobacter paspali* (BERKUM & BOHLOOL, 1980).

Através da medida da atividade da nitrogenase pelo método da redução de acetileno, foi demonstrado que progênies S1 de milho originadas da variedade VR-1, apresentaram taxas de atividade da nitrogenase mais altas do que a variedade original. Dentre as 276 progênies S1 plantadas no campo, 17 (dezessete) foram selecionadas para avaliação após pré-seleção. Foi observada variabilidade dentro das linhagens, mas também foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens. As melhores linhagens demonstraram médias de atividade da nitrogenase de 2026, 2315 e 7124 nmoles de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/g de raízes secas/h, enquanto a cultivar original reduziu apenas 313 nmoles (BULOW & DOBEREINER, 1975).

Plantas de *Pennisetum americanum* (L.) K. Shum., inoculadas no campo com *Azospirillum brasilense* (Sp 13t) também apresentaram respostas diferentes de acordo com seu genótipo. Inicialmente, 6 (seis) hí-

bridos e 15 (quinze) linhagens foram avaliadas quanto à resposta à inoculação, medindo-se o peso seco, %N, N total e atividade de redução de acetileno. O híbrido Gahi 3 apresentou 31,7% de ganho no peso seco e 37,4% de ganho de N total em relação ao seu controle. Nenhuma das linhagens respondeu à inoculação. As taxas de redução de acetileno foram baixas para todos os genótipos, não sendo suficientes para explicar o aumento da produção e confirmar o efeito da inoculação. Os genótipos que foram testados no segundo ano confirmaram a repetibilidade dos resultados, tanto positivos como negativos, mas não em termos de significância estatística (BOUTON et al., 1979).

Experimentos de campo foram ainda realizados objetivando verificar o efeito do genótipo do milho na interação entre a atividade da nitrogenase (N<sub>2</sub>-ase) nas raízes e da nitrato-redutase (NR) nas folhas. A cultivar Piranão apresentou maior atividade da N<sub>2</sub>-ase do que a UR-1. Linhagens da UR-1 em S2, selecionadas para alta e baixa fixação de N<sub>2</sub> apresentaram diferenças significativas entre si. Foi observada uma correlação negativa e altamente significativa entre a atividade da N<sub>2</sub>-ase e da NR nos experimentos. A proporção do aumento da atividade da N<sub>2</sub>-ase e queda da NR variou com a idade da planta e com o nível de nitrato no solo. Portanto, é de interesse o desenvolvimento de trabalhos de melhoramento de milho que avaliem simultaneamente a atividade dessas duas enzimas para a obtenção de genótipos que permitam a complementação da fixação de N<sub>2</sub> com a adubação nitrogenada ou vice-versa (BALDANI et al., 1979).

ELA et al. (1982) reportaram a possibilidade de aumentar a fixa-

ção biológica de nitrogênio, em raízes de milho, através da pré-avaliação e seleção. Foram utilizados híbridos e linhagens de milho para inoculação com *Azotobacter vinelandii*. Foram avaliadas 1450 plantas de milho de 180 diferentes lotes de sementes, quanto à capacidade de reduzir acetileno. A maioria das plantas não mostrou níveis detectáveis de etileno ( $C_2H_4$ ), entretanto algumas apresentaram taxas superiores a 8 nmoles/h. Essas plantas pertenciam a um grupo restrito de lotes de sementes. Híbridos ou linhagens com alta produção, provenientes da região centro-oeste dos E.U.A., apresentaram-se inativos quanto à redução de  $C_2H_2$ . Por outro lado, as plantas que apresentaram atividade de redução de  $C_2H_2$  tinham, invariavelmente, pelo menos um dos pais provenientes da América do Sul ou Central. Através da seleção das plantas que apresentaram redução de acetileno, auto-fecundação das mesmas ou cruzamento com plantas inativas para essa característica, foi possível aumentar a frequência de plantas ativas, bem como os níveis de redução de acetileno nas raízes.

Da mesma forma que o genótipo da planta em estudo tem mostrado um papel importante na interação planta-bactéria, experimentos têm sido reportados demonstrando um possível papel do genótipo da bactéria no estabelecimento da relação.

Inicialmente foi detectada a presença de duas classes de plasmídeos em *Azospirillum brasilense*: pCE1 e pCE2 de 125 Md e 65 Md, respectivamente. Quando as células da bactéria foram submetidas ao tratamento com acridina orange, perderam os plasmídeos e, concomitantemente, a capacidade de crescer em meio de cultura sem uma fonte de nitro-

gênio mineral (LEMOS et al., 1979).

Recentemente têm sido verificadas discrepâncias quanto ao número e tamanho dos plasmídeos de *Azospirillum*. Nenhuma evidência de auto-transmissão dos mesmos foi detectada. A cura espontânea ou induzida por tratamentos com temperatura ou acridina orange, tem sido descrita. Mudanças fenotípicas concomitantes à perda do plasmídeo têm sido observadas. Entretanto, não foi possível demonstrar a existência de uma característica especificamente relacionada ao plasmídeo. Não obstante, foi sugerido que os plasmídeos de *Azospirillum* podem estar codificando características que propiciem a utilização de fontes de carbono, a resistência a metais pesados, a produção de hormônios vegetais e especificidade hospedeira-reconhecimento e fixação de N<sub>2</sub> (ELMERICH, 1983) entre outras.

Com base nos dados fisiológicos que têm sido acumulados sobre *Azospirillum*, é evidente que há necessidade de obter mutantes para entender os fatores que afetam a associação com plantas. Os mutantes devem possuir genes para: motilidade e quimiotaxia; aerotaxia; produção e utilização de substâncias que podem estar envolvidas na sua sobrevivência e proliferação na rizosfera; produção de auxinas, citocininas e outros fito-reguladores; produção e atividade de enzimas pécticas que podem auxiliar na penetração nos espaços intercelulares do córtex da raiz, e podem digerir parcialmente a lamela média favorecendo a absorção de nutrientes pela raiz; etc (OKON, 1985).

#### 4- MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4-1- Isolamento e Identificação das Estirpes de *Azospirillum*.

###### 4-1-1- Material Vegetal.

Foram obtidas sementes de teosinte e milho do Banco de Germoplasma de Milho do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP. Foram utilizados quatro materiais diferentes: Teosinte Perene (*Zea diploperennis*, originário da Guatemala, Teosinte Central Plateau (*Zea mays mexicana*) oriundo do México, e os híbridos simples F1 (902 X 903) derivado de uma população Cateto, e o F1 [937 (F1 ZN X ZD) X 910] derivado de uma população Tuxpeño.

Os materiais vegetais foram cultivados no Campo Experimental de Milho da UNICAMP, em latossolo vermelho escuro, utilizando-se o delineamento de blocos ao acaso, com 10 repetições. O espaçamento foi de 1,00 X 0,20 m com linhas de 2,5 m. A calagem e adubação foram feitas de acordo com os resultados da análise de solo. Aplicou-se 1,7 t de calcáreo dolomítico por hectare (ha), 60 dias antes do plantio. A adubação foi feita no sulco de plantio para suprir as necessidades de 70 e 20 kg de K<sub>2</sub>O e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por ha, respectivamente, com a aplicação da fórmula comercial 4-14-8. O fornecimento de N foi equivalente a 20 kg de N por ha.

#### 4-1-2- Meios de Cultura.

Para o isolamento, identificação e contagem de *Azospirillum* foram utilizados os seguintes meios: NFB simples e com diferentes suplementações, batata (BMS) e solução salina para diluição; descritos abaixo (BALDANI & DOBEREINER, 1979).

##### 4-1-2-1- Meio NFB Semi-sólido:

5 g de ácido málico  
0,5 g de fosfato bibásico de potássio  
0,2 g de sulfato de magnésio  
0,1 g de cloreto de sódio  
0,02 g de cloreto de cálcio  
2 ml de solução de micronutrientes para NFB  
2 ml de azul de bromotimol (solução alcoólica 5%)  
4 ml de Fe EDTA 1,64%  
1 ml de solução de vitaminas para NFB  
Completar para 1000 ml com água destilada  
pH 6,8 a 7,0  
1,75 g de ágar

##### 4-1-2-2- Meio Batata Sólido (BMS):

200 g de batata  
2,5 g de ácido málico  
2,0 g de hidróxido de potássio  
2,5 g de sacarose  
1 ml de solução de vitaminas para NFb  
Completar para 1000 ml com água destilada  
pH 6,8 a 7,0  
15 g de ágar

4-1-2-3- Solução de Micronutrientes para NFb:

0,2 g de molibdato de sódio  
0,235 g de sulfato de manganês  
0,28 g de ácido bórico  
0,008 g de sulfato de cobre  
0,024 g de sulfato de zinco  
Completar para 200 ml com água destilada

4-1-2-4- Solução de vitaminas para NFb:

10 mg de biotina  
20 mg de piridoxina  
Completar para 100 ml com água destilada

#### 4-1-2-5- Solução Salina para Diluição:

3,4 g de fosfato monobásico de potássio  
0,2 g de sulfato de magnésio  
0,1 g de cloreto de sódio  
0,02 g de cloreto de cálcio  
2 ml de solução de micronutrientes para NFb  
Completar para 1000 ml com água destilada  
pH 6,8 a 7,0

#### 4-1-3- Cultura de Enriquecimento e Estimativa da Atividade da Nitrogenase através da Redução de Acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>).

Na época de florescimento de cada material, foram coletadas raízes de duas plantas por parcela, colocadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório. As raízes foram lavadas cuidadosamente, retirando-se ao máximo os resíduos de solo. Após a lavagem, as raízes foram excisadas, colocadas em água destilada e separadas em duas partes, uma das quais foi utilizada para esterilização superficial em solução de cloramina T 1%. O tempo de esterilização foi de 30 minutos. Após a esterilização, as raízes foram lavadas em água destilada e deionizada, por 10 minutos. Em seguida foram colocadas em tampão fosfato 0,025 M (pH 7,0) e novamente lavadas em água destilada e deionizada. As duas últimas etapas tiveram o mesmo tempo de duração

que a anterior.

Pedaços de 0,8 a 1,0 cm das raízes esterilizadas, bem como daquelas que foram somente lavadas, foram cortados, amassados com pinça, colocados em frascos de 12 ml, contendo 5 ml de meio NFB semi-sólido e fechados com rolhas de algodão. Os frascos foram, então, incubados a 32 °C, por 24 horas, para crescimento de *Azospicillum* spp. Após a incubação, as rolhas de algodão foram substituídas por rolhas de borracha para a injeção de 10% de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (v/v) nos frascos, prosseguindo-se a incubação por uma hora a 32 °C, para determinação da atividade da nitrogenase por cromatografia gasosa, através da quantificação do etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) formado pela redução do acetileno. A quantificação do etileno formado foi feita em cromatógrafo VARIAN modelo 2440 SS, a gás, com uma coluna (1,5 m X 1,5 mm) de Poropak N a 110 °C, utilizando-se N<sub>2</sub> como gás de arraste, com um fluxo de 10 cm/15 s. O volume da amostra injetada foi de 0,5 ml e utilizou-se um detector IC. Foi utilizado um padrão contendo 500 ppm de etileno, do qual injetou-se também uma amostra de 0,5 ml no cromatógrafo, para o cálculo do número de nmoles de etileno presente nas amostras.

#### 4-1-4- Contagem do Número de *Azospicillum*.

Utilizou-se o método do número mais provável (NMP) (FINS-TEIN, 1972) com diluições, de raízes esterilizadas e lavadas, em solu-

ção salina.

Uma parte das raízes lavadas e das esterilizadas de cada material (1 g) foi macerada e diluída em 9 ml de solução salina. A partir dessa diluição inicial procedeu-se a diluição até a ordem de  $10^{-7}$ . Uma alíquota de 0,1 ml das diluições  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  foi colocada em frascos contendo meio NFb semi-sólido suplementado com extrato de levedura (20 mg/l). Os frascos foram incubados a 32 °C para crescimento da bactéria e contagem aos 3, 5 e 7 dias.

#### 4-1-5- Purificação e Identificação das Espécies de *Azospicillum*.

Feita a estimativa da atividade da N<sub>2</sub>-ase, os frascos com pedaços de raízes foram submetidos a repique das culturas para isolamento e identificação de *Azospicillum* spp. O repique foi feito em frascos semelhantes aos primeiros, contendo 5 ml de meio NFb semi-sólido, que foram incubados por 24 horas a 32 °C. Essas culturas foram semeadas, com alça, em placa de petri contendo meio NFb sólido (15 g ágar/l) suplementado com 20 mg/l de extrato de levedura. Após 5 a 7 dias de incubação, colônias típicas de *Azospicillum*, brancas, simples e densas, foram transferidas para frascos contendo meio NFb semi-sólido e incubadas por 24 horas a 32 °C. As culturas que formaram películas característica foram semeadas em placa de petri contendo meio batata sólido com 5 ml de vermelho congo (solução 5%) por litro. Essas

placas foram incubadas sob as condições já descritas. As colônias formadas, que apresentavam-se puras foram transferidas para meio NFb semi-sólido e incubadas por 24 horas a 32 °C. Em seguida, uma alça de cada cultura foi inoculada em meio NFb com glucose (2%) e em meio NFb suplementado com 5 mM de nitrato de amônio, sendo incubados por 48 e 24 horas, respectivamente, para determinação da espécie e subespécie de *Azospirillum*. A espécie de *A. lipoferum* foi identificada pelo crescimento em meio com glucose diferentemente de *A. brasilense*. A caracterização de denitrificação nir+ foi feita pela observação da presença de bolhas no meio, após ligeira agitação e incubação por mais uma hora, no meio contendo nitrato.

#### 4-2- Caracterização das Estirpes de *Azospirillum* Isoladas de Teosinte e Milho.

##### 4-2-1- Resistência a antibióticos.

##### 4-2-1-1- Meios de Cultura.

Para avaliação da resistência a antibióticos em meio sólido foi utilizado o meio Mueller-Hinton, com a seguinte composição:

34,0 g de extrato de levedura

1,0 g de caseína

0,085 g de amido

Completar para 1000 ml com água destilada

15 g de ágar

pH 7,0

#### 4-2-1-2- Condições de Avaliação.

As culturas de *Azospicillum* isoladas e identificadas foram submetidas ao teste de resistência a antibióticos utilizando-se polidiscos V. Lorian.

Uma alça de cada cultura a ser testada foi inoculada em frascos contendo 5 ml de meio NFB semi-sólido e incubados por 24 h a 32<sup>o</sup> C. Após o crescimento foram retirados 0,1 ml de cada cultura, sendo estes diluídos em 0,9 ml de solução salina. Em seguida, foram feitas diluições até a ordem de 10<sup>-5</sup>. Uma alíquota de 0,1 ml de cada uma das diluições da ordem de 10<sup>-5</sup> foi inoculada em meio Mueller-Hinton sólido, e espalhada com alça de Drigalsky. Em cada placa de petri, com meio esterilizado e já inoculado, foi colocado um polidisco de antibióticos. As placas foram incubadas a 32<sup>o</sup> C por 24 horas. Cada cultura foi testada para 21 antibióticos, por esse método.

As mesmas culturas foram inoculadas em meio NFB semi-sólido contendo 10 ppm de estreptomicina, filtrada em membrana de Millipore (0,45 u) e adicionada ao meio após esterilização.

#### 4-2-2- Produção de Ácido Indol-acético (AIA)

Vários métodos utilizando diferentes reagentes estão descritos na literatura (TANG & BONNER, 1947; CONN et al., 1957) para determinação de indóis. Alguns desses reagentes foram testados para verificação de qual funcionaria melhor nas nossas condições. Para isso, as culturas de *Aspergillus* foram submetidas a testes para a detecção da presença de produtos indólicos no meio de crescimento.

##### 4-2-2-1- Método do Reagente de Ehrlich.

As estirpes de *Aspergillus* foram inoculadas em meio NFb semi-sólido e incubadas a 32 °C por 24 horas. Após o crescimento em NFb, as estirpes foram inoculadas em frascos erlenmeyer de 50 ml contendo meio TYE (15 g/l triptona, 10 g/l extrato de levedura, 5 g/l NaCl) líquido e meio NFb líquido suplementado com 5 mM NH<sub>4</sub>Cl. O inóculo correspondeu a 10% do volume de meio fresco. Os frascos foram incubados a 32 °C sob agitação por, aproximadamente, 18 horas. Em seguida, as culturas foram transferidas para tubos de centrifuga estéreis, e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, em rotor JA-21, numa centrifuga Beckman, modelo J2-21. Os sobrenadantes foram transferidos para frascos esterilizados, para serem submetidos à reação colorimétrica com o reagente de Ehrlich.

O reagente de Ehrlich consiste em uma solução de 1 g de

para-dimetil-amino-benzaldeído (p-DMAB), 50 ml de HCl (20%) e 50 ml de etanol (96%). Alíquotas de 2 ml dos sobrenadantes das culturas foram colocadas em tubos de ensaio. A estas alíquotas adicionou-se 1 ml do reagente de Ehrlich e igual volume de éter. Esperou-se por 30 minutos para o aparecimento de uma coloração rósea. A absorbância foi medida a 530 nm em espectrofotômetro, comparando-se os valores com aqueles observados para soluções-padrão de AIA com 10, 20, 30, 40 e 50 ug/ml.

#### 4-2-2-2- Método do Reagente de Kovács.

As condições de cultura da bactéria foram as mesmas descritas no item anterior e a obtenção dos sobrenadantes das culturas também foi feita como descrito.

O reagente de Kovács consiste em uma solução de 5 g de p-DMAB, 75 ml de álcool butílico e 25 ml de HCl concentrado. Para a reação, 2 ml dos sobrenadantes das culturas foram colocados em tubos de ensaio e adicionou-se em seguida 1 ml de reagente aos sobrenadantes. Esperou-se 30 minutos para o aparecimento da coloração rósea. A absorbância foi medida como no experimento anterior.

#### 4-2-2-3- Método do Reagente de Salkowski.

Para testar o método que utiliza o reagente de Salkowski, foram utilizados sobrenadantes de culturas de *Azospirillum cresci-*

das em meio TYE líquido, NFB líquido suplementado com 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 0,1 mg/ml de triptofano (HARTMANN et al., 1983), sob as mesmas condições descritas anteriormente.

O reagente de Salkowski, descrito como específico para ácido indol-acético (TANG & BONNER, 1947), consiste em uma solução de 15 ml de  $\text{FeCl}_3$  (0,5 M), 500 ml de água destilada e 300 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Para cada 0,5 ml de sobrenadante foram utilizados 2,0 ml do reagente de Salkowski. A análise do conteúdo de AIA foi feita como descrita no item 4-2-2-1.

#### 4-3- Avaliação da Produção de Ácido Indol-acético (AIA) pela Estirpe 703 Ebc de *A. brasilense*.

##### 4-3-1- Reação Colorimétrica com o Reagente de Salkowski.

##### 4-3-1-1- Efeito de diferentes concentrações de triptofano e cloreto de amônio na produção de AIA.

TIEN et al. (1979) e HARTMANN et al. (1983), reportaram a influência da presença de amônio e de triptofano, no meio de crescimento de bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$ , sobre a quantidade de substâncias fito-reguladoras produzida pela bactéria.

Assim, para a determinação do efeito das concentrações de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>CL) e triptofano na produção de AIA por *Azospicillum*, foi realizado um experimento combinando diferentes concentrações desses dois nutrientes em meio NFb líquido.

Células bacterianas da estirpe 703 Ebc, isolada do híbrido simples F1 (902 X 903) de uma população Cateto, foram inoculadas em meio NFb semi-sólido para crescimento e, em seguida inoculadas em frascos erlenmeyer de 50 ml contendo 5 ml de meio NFb líquido suplementado com as diferentes combinações de triptofano e cloreto de amônio. Para triptofano foram usadas concentrações de 0 a 0,9 g/l, enquanto que para NH<sub>4</sub>Cl as concentrações foram 0, 5 e 10 mM. As culturas foram incubadas a 32 °C, sob agitação, por aproximadamente 18 horas. As culturas foram, em seguida, transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, em rotor JA-21. Os sobrenadantes foram analisados quanto ao teor de AIA pela reação de Salkowski, através da leitura da absorbância a 530 nm, em espectrofotômetro. Os valores de absorbância, assim obtidos, foram comparados com uma curva padrão de AIA, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 ug/ml, elaborada com o mesmo reagente.

4-3-1-2- Efeito do tempo de incubação e da concentração de triptofano na produção de AIA.

Uma alça de células da linhagem 703 Ebc de *Azospicillum*

brasileNSE foi inoculada em frascos contendo 5 ml de meio NFb semi-sólido. Os frascos foram incubados a 32 °C por 24 h. Em seguida, frascos erlenmeyer, de 50 ml, contendo 5 ml de meio NFb líquido suplementado com 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl, foram inoculados a 10% com as culturas crescidas por 24 h. Esses frascos contendo meio líquido foram incubados a 32 °C, sob agitação, durante uma noite. No dia seguinte, novos frascos contendo meio NFb líquido, suplementados com diferentes concentrações de triptofano (50, 100, 200 e 400 ug/ml), foram inoculados utilizando as culturas anteriores como inóculo a 5%. Amostras foram retiradas, a intervalos de tempo regulares, para avaliação da produção de AIA pelo método de Salkowski. Os ensaios foram feitos com três repetições para cada tratamento.

#### 4-3-1-3- Produção de AIA das Estirpes de *Azospicillum*.

O inóculo inicial das estirpes de bactéria foi preparado como descrito para a estirpe 703 Ebc. Após a incubação, um volume de inóculo igual a 10% do volume de meio fresco, foi acrescentado ao meio NFb líquido suplementado com 5mM NH<sub>4</sub>CL e 0,1 mg/ml de triptofano. Decorridas 18 horas de incubação em banho-maria, com agitação, a 32 °C, as culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos em rotor JA-21, e os sobrenadantes foram utilizados para a reação colorimétrica com o reagente de Salkowski.

4-4- Quantificação e Metabolismo do AIA, em Culturas de *Azospirillum* brasileiro, por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).

4-4-1- Quantificação e metabolismo do AIA endógeno produzido pela estirpe 703 Ebc de *Azospirillum*.

Visando uma melhor análise e quantificação do AIA e outros compostos indólicos excretados no meio de cultura por *Azospirillum*, foram realizados experimentos utilizando-se HPLC e espectrometria de massa (MS). Inicialmente avaliou-se o conteúdo de AIA produzido pela estirpe 703 Ebc sem adição de padrão interno radioativo, necessário para estimar as perdas durante o processo de extração e análise.

Os ensaios com HPLC foram realizados no Depto. de Botânica da Universidade de Glasgow, Escócia, e os ensaios com MS foram realizados no Depto. de Genética Florestal e Fisiologia de Plantas da Universidade Suéca de Ciências Agrícolas, na Suécia.

4-4-1-1- Análise qualitativa por HPLC e MS de indóis produzidos por *Azospirillum*.

Um litro da cultura da estirpe 703 Ebc, crescida em NFb líquido suplementado com 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl e 100 mg de triptofano por litro, foi crescido a 32 °C sob agitação, por 18 horas. Após a incuba-

ção, a cultura foi avaliada quanto à produção e metabolismo do AIA. Para determinação da produção de AIA foram utilizados 900 ml da cultura. A esse volume foram adicionados polivinilpirrolidona (PVP), para a eliminação de impurezas, e 20 mM de dietiltiocarbamato, agente anti-oxidante. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 15000 rpm por 10 minutos. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,5-8,0 e fracionado em acetato de etila (ETOAc) em funil de separação. Esse fracionamento foi feito 3 (três) vezes com 1/3 do volume por vez, obtendo-se, assim, a fração básica do extrato. A seguir, ajustou-se o pH para 2,5-3,0, repetindo-se a extração com ETOAc, obtendo-se a fração ácida.

As frações básica e ácida foram secas a 37 °C em evaporador rotatório e ressuspendidas em um pequeno volume de ETOAc e secas novamente sob fluxo contínuo de nitrogênio. As frações foram mantidas no gelo até a realização da cromatografia.

Para a cromatografia, as frações básica e ácida foram ressuspendidas em 1 ml de uma solução 30% de metanol (MeOH) em 0,5% de ácido acético. Uma amostra de 1 µl foi injetada em uma coluna de 250 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro, empacotada com ODS Hypersil (5 µm). A amostra foi eluída com um gradiente de 30-70% de MeOH em 0,5% de ácido acético. O tempo de corrida foi de 30 minutos com um fluxo de 1 ml por minuto. O AIA e outros compostos indólicos foram detectados em um detector de absorvância de ultra-violeta a 280 nm e por um fluorímetro com excitação a 280 nm e emissão a 350 nm. As frações correspondentes aos picos indólicos detectados por HPLC foram coletadas e trimetilsililadas para serem submetidas a GC-MS-SIM (monitoramento de

ções selecionados) como descrito por ERNSTSEN et al., 1987.

Para avaliação do metabolismo do AIA foram utilizados 100 ml da cultura da estirpe 703 Ebc de *Azospicillum*. Para isso, adicionou-se 3 µl de uma solução contendo 7 µCi de [2'-14C]-AIA aos 100 ml de cultura que, em seguida, foram incubados por uma hora, sob agitação. Após a incubação, adicionou-se PVP e dietiltiocarbamato à suspensão de células e, após centrifugação, realizou-se os fracionamentos ácido e básico, em ETOAc, como descrito.

#### 4-4-1-2- Quantificação do AIA, pelo método da diluição isotópica, de culturas de *Azospicillum*.

Apesar do AIA e outros compostos indólicos terem sido identificados como compostos endógenos da estirpe 703 Ebc, para a quantificação do AIA produzido pela bactéria realizou-se um experimento adicionando-se um padrão interno radioativo.

Foram utilizados 100 ml das estirpes 703 Ebc e 404 Ed, crescidos como descrito anteriormente, aos quais adicionou-se uma solução contendo 148 ng de [2'-14C]-AIA, com atividade específica igual a 804 dpm/ng. Adicionou-se PVP e 20 mM de dietiltiocarbamato à cultura, e procedeu-se o fracionamento e análise por HPLC como já descrito. Na falta de um fluorímetro, foi utilizado um monitor de absorbância operando a 280 nm, como detector para HPLC. Isso tornou necessário

o uso de HPLC de fase normal para purificação dos extratos antes da análise por HPLC de fase reversa. A radioatividade associada ao pico de AIA na análise por fase reversa, foi medida em um cintilômetro. Para HPLC de fase normal, utilizou-se uma coluna de 250 X 4,4 mm, empacotada com Spherisorb CN (5 µm). A fase móvel foi hexano/acetato de etila (85:15, v/v) contendo 0,2% de ácido acético e 3% de etanol, com fluxo de 1ml por minuto. A coluna para HPLC de fase reversa era de 250 X 4,4 mm, empacotada com ODS Hypersil (5 µm). Metanol 35% em 0,5% de ácido acético aquoso, foi usado como fase móvel. O fluxo também foi de 1 ml por minuto.

O líquido de cintilação para análise no cintilômetro foi: 300 ml MeOH, 20g PPO, 660 ml Triton X-100, 1340 ml xileno destilado.

#### 4-4-1-3- Metabolismo do AIA em *Azospirillum brasilense*.

Para avaliação do metabolismo do AIA foram utilizados 100 ml da cultura da estirpe 703 Ebc de *Azospirillum*. Para isso, adicionou-se 3 µl de uma solução contendo 7 µCi de [2'-<sup>14</sup>C]- AIA aos 100 ml de cultura que, em seguida, foram incubados por uma hora, sob agitação. Após a incubação, adicionou-se PVP e dietiltiocarbamato à suspensão de células e, após centrifugação, realizou-se os fracionamentos ácido e básico, em EtOAc, como descrito.

A fração ácida em acetato de etila foi seca ressuspendida em 15% MeOH em 0,5% ácido acético para ser submetida a HPLC de fase reversa. A amostra foi injetada num coluna 250 X 5 mm d.i. empacotada com ODS Hypersil 5 um. A fase móvel foi um gradiente de 15-55% MeOH em 0,5% ácido acético. O tempo de corrida foi de 25 minutos com fluxo de 1ml por minuto. O detector usado foi um monitor de radioatividade Reeve, operando no modo homogêneo a 32 cps.

4-4-2- Análise do AIA endógeno e seu metabolismo em raízes de milho inoculadas e não inoculadas com *Azospirillum*.

4-4-2-1- Material Vegetal.

Como material vegetal foi utilizado o híbrido simples F1 (902 X 903) de milho Cateto.

4-4-2-2- Material Bacteriano.

A estirpe 703 Ebc de *A. brasilense* foi aplicada como inoculante.

4-4-2-3- Meio de Crescimento das Plântulas.

As plântulas foram mantidas em solução nutritiva com a

seguinte composição:

1 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 136,1 g/l

2 ml de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 246,5 g/l

1 ml de solução de micronutrientes (2,86 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  
1,81 g/l  $\text{MnCl}_2$ ; 0,22 g/l  $\text{ZnSO}_4$ ; 0,08 g/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  
0,009 g/l  $\text{H}_2\text{MoO}_4$ )

1 ml de solução de FeEDTA (33,2 g/l  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 3,65 g/l  
 $\text{NaOH}$ ; 25 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

#### 4-4-2-4- Preparo do Inóculo.

Uma alça da estirpe de bactéria foi inoculada em frascos contendo meio NFB semi-sólido. Os frascos foram incubados a 32 °C por 24 horas. Em seguida, 0,5 ml de cada cultura foram inoculados em 4,5 ml de meio NFB líquido suplementado com cloreto de amônio, e incubados a 32 °C, sob agitação por uma noite. Essas culturas foram utilizadas como inóculo para novas culturas a serem crescidas até atingirem um número aproximado de 10 milhões de células por ml. Essas culturas foram então utilizadas para a inoculação das plântulas em solução nutritiva.

#### 4-4-2-5- Germinação e Crescimento das Plântulas.

Sementes do híbrido F1 (902 X 903) Cateto foram germinadas em papel de germinação por 3 dias. Após esse período, essas plântulas foram transferidas para potes contendo 1,6 l de solução nutritiva e inoculadas com 5 ml de cultura da estirpe 703 Ebc de *A. brasiliense*. O desenvolvimento das plântulas foi conduzido em câmara de crescimento a  $27 \pm 1$  °C, com fotoperíodo de 14 horas de luz por 10 horas de escuro. Após 7 dias, as plântulas foram coletadas e analisadas quanto ao metabolismo do AIA endógeno. O mesmo procedimento foi seguido para as plântulas não inoculadas, isto é, o controle.

#### 4-4-2-6- Análise do metabolismo do AIA das Raízes de Milho por HPLC.

Cinco plântulas de milho foram inoculadas com a bactéria e crescidas em solução nutritiva. As raízes das plântulas foram excisadas e incubadas em uma solução contendo 7  $\mu$ Ci de [2'-<sup>14</sup>C]- AIA, por uma hora, sob agitação. Após a incubação, as raízes foram imediatamente maceradas em 100 ml de metanol (MeOH) e filtradas, a seguir, em papel de filtro. Adicionou-se PVP e 20 mM de dietiltiocarbamato, e procedeu-se o fracionamento com acetato de etila, como descrito anteriormente (Item 4-4-1-1).

A fração ácida em acetato de etila foi analisada por HPLC acoplada a um monitor de radioatividade como já descrito.

#### 4-5- Efeito da Adição de Diferentes Nutrientes ao Meio de Cultura para Crescimento de *Azospicillum*.

Foram avaliados diferentes meios de crescimento para *Azospicillum* que possibilitassem a verificação dos efeitos da adição de extratos de raízes no crescimento da bactéria em estudo.

##### 4-5-1- Método da Placa Gradiente.

Objetivando a posterior adição de extratos de raízes de plantas genotipicamente diferentes ao meio de cultura, de maneira a formar um gradiente de concentração que permitisse a detecção quantitativa e/ou qualitativa de um ou mais fatores limitantes para o crescimento da bactéria, utilizamos inicialmente a técnica de placa gradiente.

Placas de petri contendo 10 ml de meio NFb sólido, suplementado com 20 mg de extrato de levedura por litro, foram preparadas e inclinadas. Após a solidificação do meio, adicionou-se 10 ml de ágar-água, esterilizado, por placa (Esquema I). As placas foram deixadas em repouso por 24 horas para a difusão dos nutrientes do meio NFb para a camada de ágar-água, esperando-se formar um gradiente de concentração de nutrientes.

Esquema I:



Após este período de tempo, foi feita a semeadura de uma suspensão de células de uma diluição  $10^{-5}$ , de cada cultura de bactéria, espalhando-se com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a  $32^{\circ}\text{C}$  para crescimento das colônias. Para cada estirpe foram feitas três repetições. O resultado do crescimento nessas placas seria considerado como padrão para comparação com placas em que o meio NFb sólido seria substituído por meio agar-água suplementado com extratos de raízes. As placas foram avaliadas quanto ao aparecimento de colônias de *Azospirillum*.

#### 4-5-2- Método da Placa com Orifício.

Visando ainda a formação de um gradiente de concentração de nutrientes que possibilitasse a determinação de um fator limitante do crescimento das estirpes de *Azospirillum*, foi utilizada a metodologia de placa com orifício.

Placas de petri foram preparadas com meio ágar-água. Após a solidificação do meio, foi feito um orifício no centro de cada placa. Nesse orifício adicionou-se alíquotas de soluções de nutrientes de acordo com o quadro abaixo:

---

tratamento	ác.málico	FeEDTA	ext.levedura	NH4Cl	NH4NO3
1	-	+	+	-	-
2	+	-	+	-	-
3	+	+	-	+	+
4	+	+	-	-	+
5	+	+	+	-	-
6	+	+	-	-	-
7	-	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-

---

Os nutrientes adicionados ao orifício estão assinalados com (+), e os não adicionados estão assinalados com (-). Assim, para o tratamento 1 foram adicionados 0,08 ml de solução de FeEDTA (1,64%) e 0,1 ml de solução de extrato de levedura.

Aplicou-se 0,1 ml de solução de nutriente nos orifícios, exceto para FeEDTA (0,08 ml). Foram utilizadas soluções-estoque de cada nutriente de forma a obter-se as seguintes concentrações finais: 0,05 mg/ml ácido málico; 0,2 mg/10 ml extrato de levedura; 5 mM NH4Cl e 5

mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

A sementeira de *Azospicillum* nessas placas foi feita como descrito no item anterior, tomando-se cuidado para não deixar que a suspensão de células caísse no orifício.

Foram feitas 3 repetições para cada tratamento e as placas foram incubadas a 32 °C por 5-7 dias. Após a incubação, avaliou-se o crescimento de *Azospicillum*.

#### 4-5-3- Método da Curva de Crescimento em Meio Líquido.

Uma vez que culturas de bactérias crescidas sob condições controladas em meio líquido, permitem que seja avaliado o aumento do número de células de maneira prática e, além disso mostram um padrão de crescimento nítido para as condições estabelecidas, foi utilizada esta metodologia para a avaliação dos extratos de raízes de diferentes materiais de milho.

Primeiramente, foram determinadas as condições em que os resultados obtidos seriam considerados como padrão para comparação com os resultados posteriores, observados utilizando-se os extratos.

Para isso, estirpes de *Azospicillum* foram inoculadas em meio NFb semi-sólido e incubadas a 32 °C por 24 horas. Após o aparecimento da película característica, as estirpes foram inoculadas em frascos

contendo meio NFb líquido suplementado com 5 mM NH<sub>4</sub>Cl.

#### 4-6- Efeito da Adição de Diferentes Extratos de Raízes no Crescimento de *Azospicillum*.

##### 4-6-1- Material Vegetal.

Os extratos de raízes de plântulas foram preparados utilizando-se materiais geneticamente diferentes. Foram utilizados o F1 1227 da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo e uma linhagem de Milho Americano.

Sementes desses materiais foram semeadas em vermiculita lavada e seca em estufa e irrigados com água destilada e deionizada. Seis dias após a semeadura, os endospermas aderidos às raízes das plântulas foram retirados e as plântulas foram transferidas para potes maiores, também contendo vermiculita. A irrigação dos potes foi feita com solução de Hoagland, duas vezes por semana, de maneira a manter o substrato úmido. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a  $27 \pm 1$  °C, com fotoperíodo de 14 horas de luz por 10 de escuro, por 20 ou 30 dias.

#### 4-6-2- Preparação dos Extratos de Raízes.

Após o período de crescimento, as plantas foram coletadas, suas raízes foram lavadas e excisadas. O excesso de água das raízes foi removido envolvendo-as em papel toalha. Em seguida, as raízes foram pesadas e maceradas em tampão fosfato 0,025 M (pH 6,5) numa proporção de 1:3 (peso/volume). Os macerados foram centrifugados a 15000 rpm por 15 minutos em rotor JA-21, numa centrífuga Beckman (modelo J2-21). Os sobrenadantes foram filtrados com filtros millipore (0,45 µ) esterilizados e, em seguida, diluídos até atingirem a concentração de 1:5 (volume/volume) com tampão fosfato.

#### 4-6-3- Material Bacteriano e Efeito dos Extratos de Raízes.

A linhagem Sp7 de *Azospicillum brasilense* foi utilizada como material bacteriano. A bactéria foi crescida em meio NFB semi-sólido por 24 horas a 32 °C. Uma alíquota de 0,5 ml dessa cultura foi inoculada em 4,5 ml de meio NFB líquido contendo 5 mM NH<sub>4</sub>Cl. Esse frasco foi submetido a incubação a 32 °C, sob agitação, em banho-maria. Decorridas 16-18 horas, essa cultura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos, em rotor JA-21. As células foram recuperadas, lavadas duas vezes em tampão fosfato 0,025 M (pH 6,5) e ressuspensas no mesmo tampão. Um inóculo diluído a 10<sup>-1</sup> foi adicionado em frascos contendo diferentes meios, a saber: meio NFB líquido suplementado com 5 mM NH<sub>4</sub>Cl, tampão fosfato 0,025 M, diferentes extratos vegetais diluídos em tampão fosfato.

O crescimento das células foi acompanhado pela leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro, a cada 60 minutos, a partir do tempo zero.

#### 4-7- Efeito da Inoculação de Diferentes Genótipos de Milho com Diferentes Estirpes de *Azospirillum*, em Solução Nutritiva.

Para verificação de possíveis efeitos da inoculação com *Azospirillum* no crescimento das raízes de plântulas de milho, vários experimentos foram realizados.

##### 4-7-1- Material Vegetal.

Foram utilizados inicialmente dois híbridos simples: F1 [903 (BC2/910) X 922] Cateto e o F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] Dentado.

Sementes dos dois materiais foram germinadas em papel de germinação por 3 dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para potes contendo solução nutritiva, sem nitrogênio, e submetidas a diferentes tratamentos.

Este procedimento foi seguido para todos os materiais vege-

tais crescidos em solução nutritiva.

#### 4-7-2- Preparo do Inoculante.

As estirpes 703 Ebc e 404 Ed de *A. brasilense* foram utilizadas como inoculantes.

Uma alça de cada cultura foi inoculada em frascos contendo meio NFb semi-sólido. Os frascos foram incubados a 32 °C por 24 horas. A seguir, 0,5 ml de cada cultura foram inoculados em 4,5 ml de meio NFb líquido contendo 5 mM NH<sub>4</sub>Cl e incubados a 32 °C, sob agitação, por uma noite. Essas culturas foram utilizadas como inóculo para novas culturas a serem crescidas até atingirem um número aproximado de 10 milhões de células por ml. Essas últimas culturas foram então usadas para a inoculação das plântulas em solução nutritiva.

Para todos os experimentos foi seguido o mesmo procedimento.

#### 4-7-3- Efeito da Adição de Diferentes Concentrações de Inoculantes no Crescimento das Raízes de Milho.

Potes contendo 8 litros de solução nutritiva nos quais foram colocadas as plântulas pré-germinadas, foram inoculados com as células das linhagens 703 Ebc e 404 Ed nas seguintes concentrações: 0, 0,25, 0,5 e 1,0%. As plântulas foram mantidas na solução, sob aeração,

por um período de 7 dias, em câmara de crescimento a  $27 \pm 1$  °C, sob fotoperíodo de 14/10 horas. Após esse período, foi avaliado o crescimento das raízes, calculando-se a diferença entre o comprimento inicial das mesmas, antes de serem colocadas na solução, e o final, após sete dias.

#### 4-7-4- Efeito da Adição de Diferentes Concentrações de Triptofano no Crescimento das Raízes de Milho, em Solução Nutritiva.

Uma vez que o triptofano é tido como precursor do ácido indol-acético (AIA), foi feita a adição desse aminoácido à solução nutritiva para verificar se teria algum efeito benéfico no crescimento das raízes. Assim, as plântulas pré-germinadas foram desenvolvidas em solução nutritiva, suplementada com 0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µM de triptofano, sob as condições de ambiente controlado já descritas. A estirpe 703 Ebc foi utilizada como inoculante. O crescimento das raízes foi avaliado como no experimento anterior.

#### 4-7-5- Efeito da Adição de Diferentes Concentrações de AIA no Crescimento das Raízes de Milho, em Solução Nutritiva.

Plântulas pré-germinadas em papel foram crescidas em potes contendo 8 l de solução nutritiva, sem nitrogênio, aos quais adicionou-se diferentes quantidades de AIA. Num primeiro experimento, utilizou-se as concentrações de 0, 0,050 e 0,1 mg de AIA por litro de solução

nutritiva; concentrações estas já utilizadas para outras culturas (JAIN & PATRIQUIN, 1985). Num experimento subsequente, as concentrações foram 0, 1, 3 e 5 mg de AIA por litro de solução. Nesse experimento também foi avaliado o crescimento das raízes como descrito anteriormente.

#### 4-7-6- Efeito da Adição de AIA, Triptofano, Tirosina e Fenilalanina no no Crescimento das Raízes de Milho, em Solução Nutritiva.

Para verificar possíveis efeitos sinérgicos causados pela adição de aminoácidos aromáticos na ação do AIA no crescimento das raízes de milho, foi realizado um experimento em que foram adicionados esses aminoácidos e o regulador de crescimento à solução de crescimento das plântulas. O crescimento radicular foi avaliado como já descrito.

A concentração de AIA aplicada foi determinada no experimento anterior. Utilizou-se a concentração de 0,5 mM para cada um dos amino-ácidos.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5-1- Isolamento e Identificação das Estirpes de *Azospirillum* Presentes em raízes de Teosinte e Milho.

#### 5-1-1- Estimativa da Atividade da Nitrogenase, pela Redução de Acetileno ( $C_2H_2$ ), e Contagem do Número de *Azospirillum* spp.

As médias obtidas para a redução de acetileno ( $C_2H_2$ ) para cada material podem ser observadas na Tabela 1. A estimativa da atividade da nitrogenase pelo método da redução de acetileno, usada como identificação inicial das culturas de *Azospirillum* obtidas de raízes dos diferentes materiais vegetais, mostrou valores variáveis para as amostras dentro de cada material. Essa observação possivelmente é devida à variação das condições de solo de cada parcela do ensaio de campo.

Ambos os materiais de teosinte não apresentaram valores de redução de  $C_2H_2$  detectáveis, para as raízes esterilizadas superficialmente, embora fosse observado crescimento de organismos nos frascos em que as raízes se encontravam. Esses valores de redução de acetileno foram usados somente para identificação inicial das culturas.

Tabela 1- Estimativa da Atividade da Nitrogenase pela Redução de Acetileno (nmoles C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduzido/cultura/hora).

Parcela	Raiz Lavada				Raiz Esterilizada	
	Teosinte		Milho		Milho	
	Perene	C. Plateau	Cateto	Tuxpeño	Cateto	Tuxpeño
1	2,19	1,14	3,46	2,10	0,40	1,03
2	1,59	2,17	3,20	2,50	2,00	19,70
3	1,78	1,73	4,06	14,70	7,73	5,75
4	2,98	0,31	0,43	3,70	7,35	0,58
5	4,29	1,04	0,33	4,15	3,30	11,85
6	4,12	4,38	0,65	1,48	4,33	6,40
7	2,28	2,24	0,85	1,60	7,93	6,40
8	2,48	2,02	0,93	0,48	3,73	2,23
9	4,86	2,50	0,73	2,00	2,10	4,35
10	0,81	11,62	0,55	5,73	2,10	0,70

Tabela 2- Contagem do número de *Azospicillum* presente em raízes de teosinte e milho.

Material Vegetal	Raízes Lavadas (células/g raízes)	Raízes Esterilizadas (células/g raízes)
Teosinte Perene	$4,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$
Teosinte C. Plateau	$4,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$
Milho Cateto	$0,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$
Milho Tuxpeño	$7,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$

Os valores expostos na Tabela 2 mostram que embora houvesse um número considerável de organismos infectando as raízes, quando esses eram colocados em meio sem fornecimento de nitrogênio mineral, seu crescimento foi retardado, não sendo possível detectar-se a atividade de redução de acetileno para as culturas em que seguramente só encontrava-se bactérias provenientes do interior da raiz, ou seja, para as raízes esterilizadas superficialmente.

O maior número de organismos observado par raízes esterilizadas em relação àqueles observados para raízes lavadas poderia ser explicado pela eliminação de organismos competidores presentes na rizosfera, tornado as condições de crescimento mais favoráveis. MAGALHÃES et al. (1979) referiram-se à existência de organismos produtores de antibióticos na rizosfera de gramíneas. A presença desses organismos, nas raízes não esterilizadas superficialmente poderia estar prejudicando o crescimento das bactérias no meio para contagem.

Não foram observadas diferenças significativas entre o número de organismos encontrados nas raízes dos diferentes materiais de teosinte e milho.

#### 5-1-2- Purificação e Identificação das Estirpes de *Azospicillum*.

As colônias características de *Azospicillum* spp em meio NFb sólido e em meio batata suplementado com vermelho congo, podem ser vistas nas Figuras 1A e 1B, respectivamente.

Foram isoladas 23 estirpes de *Azospirillum* spp cujo crescimento foi avaliado em diferentes meios (Tabela 3) para sua classificação em espécie e grupo. Dentre as 23 estirpes, 13 foram classificadas como pertencentes à espécie *Azospirillum lipoferum* devido a seu crescimento em meio com 0,5% de glucose, como fonte de carbono. As demais estirpes não apresentaram crescimento nesse meio e foram, portanto classificadas como *Azospirillum brasilense*. Somente duas das linhagens de *A. brasilense* foram consideradas como pertencentes ao grupo nir+ pela sua capacidade de dissimilação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> quando em condições de falta de O<sub>2</sub>. Essas culturas foram reconhecidas pela liberação de O<sub>2</sub>, após agitação e incubação em meio contendo nitrato. A Tabela 4 mostra, resumidamente, a classificação das estirpes de *Azospirillum*, isoladas de teosinte e de milho, de acordo com BALDANI & DOBEREINER (1979).

Não foi possível estabelecer qualquer correlação entre a fonte e a espécie de *Azospirillum* isolada. De maneira geral, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* ocorreram tanto em teosinte como em milho.

## 5-2- Caracterização das Estirpes de *Azospirillum* Isoladas de Teosinte e Milho.

### 5-2-1- Resistência a Antibióticos.

O teste de resistência a antibióticos feito utilizando-se polidiscos, avaliou a resistência a 21 antibióticos pertencentes a diferentes grupos, a saber: aminoglicosídeos, cefalosporinas, cloranfenicol, macrolíticos, penicilinas, quimioterápicos, sulfas, etc. Os parâmetros utilizados para a avaliação, isto é, halo mínimo de sensibilidade em torno dos discos e concentração do antibiótico, são mostrados na Tabela 5. A Tabela 6 mostra o comportamento de cada estirpe de *Azospicillum*. As estirpes consideradas sensíveis (-) foram aquelas que apresentaram crescimento a partir do halo mínimo de sensibilidade. Foram consideradas resistentes (+), aquelas linhagens que apresentaram crescimento dentro do halo mínimo de sensibilidade.

A classificação dos antibióticos em grupos foi feita de acordo com sua fórmula química (grupos 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 8) e de acordo com seu uso terapêutico (grupos 6 e 9).

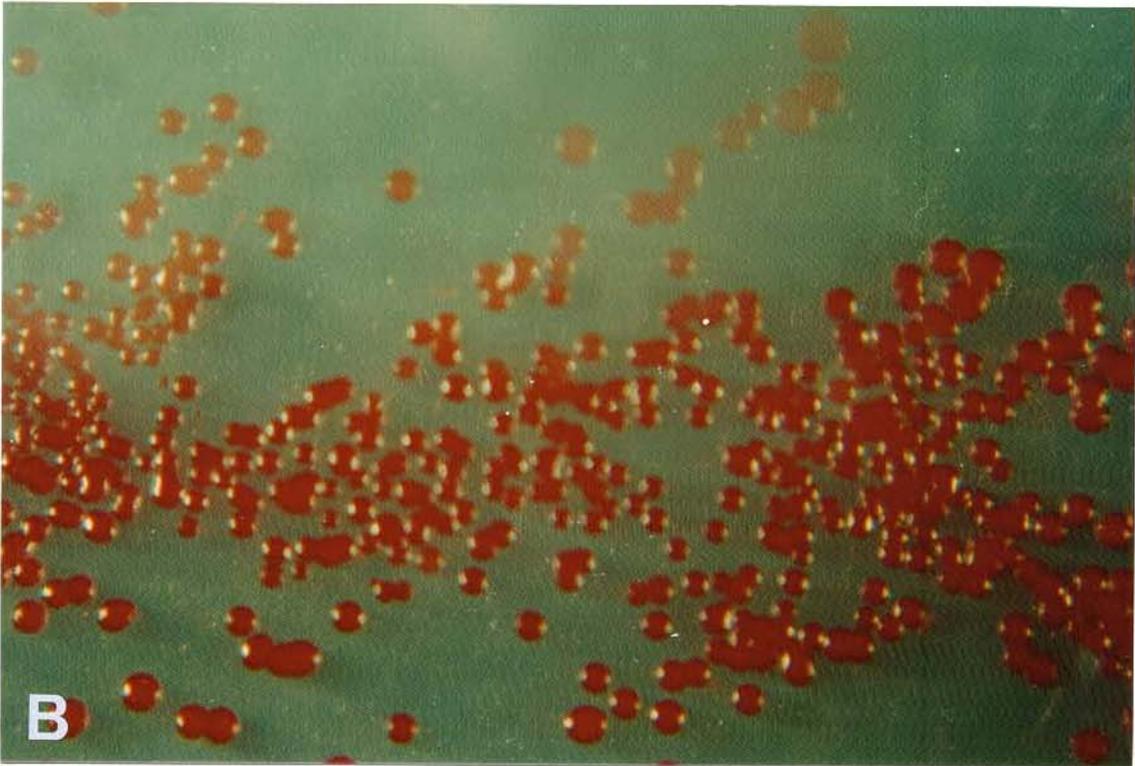
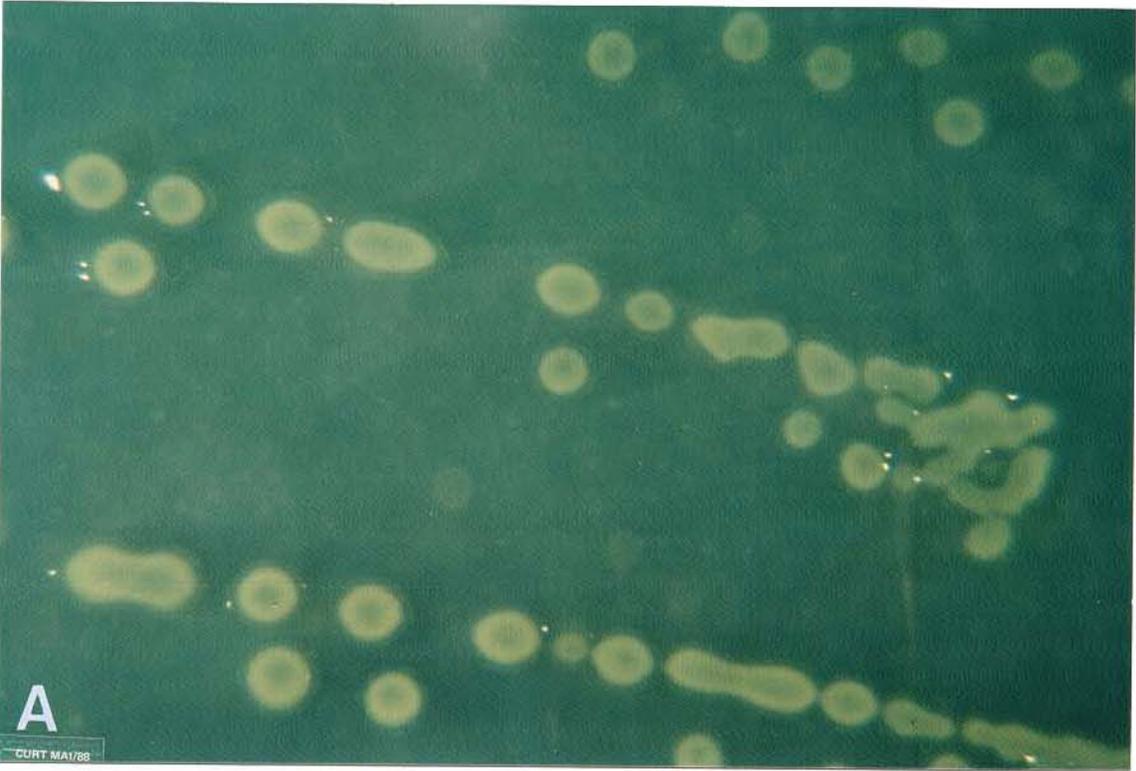


Tabela 3- Características para identificação de *Azospirillum* crescido em diferentes meios de cultura.

Característica	<i>A. lieofetum</i>		<i>A. brasilense</i>	
	nir+	nir-	nir+	nir-
Crescimento em NFb semi-sólido	bom	bom	bom	bom
Crescimento em NFb semi-sólido sem malato, sem indicador e com 0,5% glucose	bom	fraco	fraco	fraco
Crescimento em NFb semi-sólido com 5mM de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	bom geralmente sem produção de gás	bom com gran- de produção de gás	bom sem produção de gás	bom sem produção de gás

Tabela 4- Classificação das estirpes de *Azospicillum* isoladas de teosinte e milho.

Fonte	Grupo	<i>A. lieofecum</i>	<i>A. brasilense</i>
Teosinte Perene	nir-	101 Rd	701 Rd
		401 Rc	901 Ra
		401 Rd	
		501 Ra	
	nir+		601 Rc
Teosinte C. Plateau	nir-	202 Rb	802 Ra
		502 Rb	
		702 Ra	
		702 Rd	
		902 Ra	
		902 Rd	
Milho Cateto	nir-		303 Ea
			703 Ebc
			803 Ed
			903 Rd
Milho Tuxpeño	nir-	504 Ea	204 Ed
		704 Ed	904 Ed
	nir+		404 Ed

Tabela 5- Halo mínimo de sensibilidade aos antibióticos para o teste de resistência em polidiscos.

Grupo	Antibiótico	Concentração (ug)	Halo mínimo de sensibilidade(mm)
1-Aminoglicosídeos	Amicacina	30	17
	Canamicina	30	15
	Netilmicina	30	13
	Gentamicina	10	13
	Tobramicina	30	13
	Estreptomicina	(*)	(*)
2-Cefalosporinas	Cefalotina	30	16
	Cefotaxima	30	20
	Cefoxitina	30	14
3-Cloranfenicol	Cloranfenicol	30	15
4-Macrolíticos	Eritromicina	15	15
	Lincomicina	2	12
5-Penicilinas	Ampicilina	10	13
	Carbenicilina	100	23
	Penicilina	10	16
	Oxacilina	5	12
6-Quimioterápicos	Ác.Nalidíxico	30	16
	Nitrofurantoína	300	13
7-Tetraciclinas	Tetraciclina	30	17
8-Sulfas	Trimetoprim-sulf.	25	15
9-Outros	Colistina	20	8

Antibióticos Testados (ug)	Teosinte Perene			Teosinte Central Plateau			Milho Caletó			Milho Tuxpeño		
	<i>A. lipoferus</i> 401Rd 401Rc	<i>A. brasiliense</i> 501Ra 701Rd 601Rc 901Ra	<i>A. lipoferus</i> 202Rb 502Rb 702Ra 702Rd	<i>A. brasiliense</i> 902Ra 902Rd 802Ra	<i>A. lipoferus</i> 702Ra 702Rb 502Rb 803Ed	<i>A. brasiliense</i> 303Ea 703Ebc 803Ed 903Rd	<i>A. lipoferus</i> 504Ea 704Ed	<i>A. brasiliense</i> 204Ed 404Ed 904Ed	<i>A. lipoferus</i> 504Ea 704Ed	<i>A. brasiliense</i> 204Ed 404Ed 904Ed		
Amicacina 30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Canamicina 30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Netilmicina 30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Gentamicina 10	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Tobramicina 30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Estreptomina 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cefalotina 30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Cefotaxima 30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Cefoxitina 30	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Cloranfenicol 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Eritromicina 15	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Lincomicina 2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Ampicilina 10	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Carbelicina 100	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Penicilina 10	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Oxacilina 5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Ac. Valdirxico 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nitrofurantoina 300	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Tetraciclina 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Trisetoprisulfametox. 25	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Colistina 20	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rifampicina 10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	

Dentre as 23 estirpes isoladas de diferentes materiais vegetais, 6 mostraram resistência a um grande número de antibióticos, entre 14 e 17. A estirpe 702 Rd apresentou resistência a 17 antibióticos, sendo que sua resposta foi consistente dentro dos grupos de classificação dos mesmos como, por exemplo, para os aminoglicosídeos. O comportamento das estirpes 401 Rd, 901 Ra, 202 Rb, 803 Ed e 404 Ed foi semelhante. Entretanto, podemos observar a inconsistência da resposta para alguns antibióticos pertencentes ao mesmo grupo. A linhagem 401 Rd apresentou resistência à cefalotina e cefoxitina e foi sensível a cefotaxima, dentro do grupo das cefalosporinas. O halo mínimo de sensibilidade para esta droga é um pouco maior do que aquele indicado para as outras duas (Tabela 5), usadas na mesma concentração, sugerindo que a sensibilidade à cefotaxima, de maneira geral, é maior do que aos outros dois antibióticos. Assim, a sensibilidade da estirpe 401 Rd à cefotaxima e resistência à cefalotina e cefoxitina, poderia ser devida a uma menor capacidade da célula bacteriana em impedir a penetração da droga no seu local de ação e interação com seu alvo, a parede celular, ou incapacidade de inativar o antibiótico pela ação de beta-lactamases específicas (SANDE & MANDELL, 1983). Quanto ao grupo das penicilinas, o comportamento da estirpe 401 Rd pode ser devido à incapacidade de algumas drogas usadas (carbenicilina e penicilina) de permeabilizar o seu sítio de ação (parede celular) ou devido a inativação dos antibióticos por penicilinases específicas (MANDELL & SANDE, 1983). Essa estirpe de bactéria mostrou-se resistente à colistina (grupo 9), que é um detergente catiônico de ação tensoativa, o que permite sua interação com a estrutura das membranas celulares, rompendo-as. Por conseguinte, essa resistência é um fato bastante interessan-

te. A parede celular das bactérias resistentes pode impedir o acesso da colistina às membranas celulares. A resistência apresentada pela estirpe 401 Rd demonstra que isso pode ter ocorrido e, portanto, a sua parede celular também pode ter agido seletivamente quanto às penicilinas e cefalosporinas que também atuam na parede celular. Logo isso explicaria os diferentes resultados encontrados para as drogas desses grupos, uma vez que possuem pequenas diferenças estruturais que podem ser importantes, como ocorre com a penicilina e oxacilina. A estirpe 401 Rd também apresentou resistência aos macrolíticos que atuam na subunidade 50S dos ribossomas.

A linhagem 901 Ra também mostrou consistência de resultados com relação a certos grupos químicos (grupos 2, 3 e 4). As variações observadas para os aminoglicosídeos pode ser devida a fatores de permeabilidade da célula às drogas, bem como a ação de enzimas metabolizadoras específicas de aminoglicosídeos. Os aminoglicosídeos podem ser divididos em famílias que englobam aqueles que guardam entre si maior semelhança química. A família da canamicina engloba as canamicinas A e B, a amicacina e a tobramicina. A linhagem de bactéria apresentou sensibilidade comum aos componentes desta família, indicando que qualquer que sejam os fatores inativadores ou de bloqueio da ação dos aminoglicosídeos que possuem dois açúcares ligados ao radical 2-desoxiestreptomina, eles não estão presentes nessa estirpe. Por outro lado, a estirpe 901 Ra mostrou-se resistente à ação do trimetroprim-sulfametoxazol que inibe forte e seletivamente a diidratofolato redutase de organismos inferiores, uma função enzimática crucial em todas as espécies desses organismos (MANDELL & SANDE, 1983). A mesma resistência foi de-

tectada nas estirpes 202 Rb, 802 RA, 703 Ebc, 803 Ed, 903 Rd, 404 Ed e 904 Ed. Essa resistência pode ter aparecido através de mutação ou pela presença de fatores R (bactérias Gram-negativas) ou pela presença de um gene cromossomial como em *Staphylococcus aureus* (MANDELL & SANDE, 1983).

Resistência aos aminoglicosídeos também foi encontrada para a estirpe 202 Rb. Com exceção da amicacina, droga de difícil desenvolvimento de resistência, foi observada resistência para todos os demais aminoglicosídeos testados. Os resultados observados para as cefalosporinas nesta linhagem de bactéria foram consistentes com aqueles da estirpe 401 Rd (Tabela 5). A estirpe 202 Rb apresentou, entretanto, resistência a todas as penicilinas usadas. Isto indica que deve possuir os diferentes fatores de inativação de cada uma delas de acordo com as sutilezas de suas naturezas químicas.

Para a a linhagem 702 Rd de *Azospicillum*, deve-se chamar a atenção para dois antibióticos, em particular: amicacina e tetraciclina. A resistência a amicacina apresentada por essa estirpe bacteriana e pela estirpe 401 Rd, é importante por este ser um antibiótico para o qual é difícil encontrar-se inativação enzimática. A resistência à tetraciclina chama a atenção pelo fato da resistência a esta droga estar ligada a plasmídeos (SANDE & MANDELL, 1983), podendo ser adquirida por conjugação e podendo ainda estar ligada a outros genes plasmidiais. Essa resistência também foi apresentada pela estirpe 404 Ed. Outro antibiótico cuja resistência normalmente está ligada à presença de plasmídeos é o cloranfenicol. Para este último antibiótico apenas

três linhagens de bactéria mostraram resistência (Tabela 6).

As estirpes 802 Ra, 703 Ebc, 903 Rd e 904 Ed também apresentaram resistência a um amplo número de antibióticos. Mostraram-se, porém, bastante sensíveis aos aminoglicosídeos (Tabela 6). Duas dessas estirpes, 802 Ra e 703 Ebc, possuem resistência ao ácido nalidíxico, poderoso agente bactericida para Gram-negativas, que inibe a síntese de DNA. A estirpe 803 Ed apresentou a mesma característica.

Quatro linhagens de *Azospirillum* foram sensíveis a todos os antibióticos testados: 601 Rc, 502 Rb, 303 Ea, 504 Ea e 204 Ed. Isto indica a inexistência de genes plasmidiais e cromossomiais que determinem a presença de fatores como: impermeabilizantes celulares que impossibilitem ou dificultem a entrada da droga na célula; enzimas inativadoras da atividade anti-microbiana; etc.

Há ainda aquelas estirpes cujo espectro de resistência inclui poucos antibióticos de grupos diferentes porém, em alguns casos, de modo de ação semelhante.

As estirpes 701 Rd, 702 Ra e 902 Rd mostraram resistência à estreptomicina e lincomicina. A primeira atua na parede celular e a resistência pode ser em decorrência da deficiência de mecanismos de transporte e ligação do antibiótico ao seu alvo. A segunda droga atua na subunidade 50S dos ribossomas e a resistência é causada pela atuação de enzimas inativadoras da droga.

Não foi possível estabelecer qualquer correlação entre a resistência aos antibióticos apresentada pelas bactérias e o material vegetal do qual foram isoladas. Desta forma, a variabilidade encontrada com respeito a essa característica deve estar relacionada a outros fatores como, por exemplo, solo, uma vez que já foi reportada a existência na rizosfera de gramíneas, bem como no solo em que são cultivadas, de um grande número de organismos produtores de antibióticos (ROBBS, 1960; MAGALHÃES et al., 1979; BALDANI & DOBEREINER, 1979).

#### 5-2-2- Produção de Ácido Indol-acético (AIA).

##### 5-2-2-1-Ensaio Preliminares.

O ensaio em que se empregou o reagente de Ehrlich para a detecção de indóis não apresentou resultado satisfatório. Após 30 minutos da adição do reagente aos sobrenadantes das culturas, não foi observado o aparecimento da coloração rósea indicativa da reação positiva.

Quando da utilização do reagente de Kovács, entretanto, observou-se o aparecimento da coloração rósea nos sobrenadantes das culturas crescidas em meio TYE. Porém, quando o reagente de Kovács foi adicionado ao meio TYE puro, a mesma coloração foi observada. Uma vez que o meio TYE leva triptona em sua composição, a reação positiva verificada foi resultante da ação do para-dimetil-amino-benzaldeído (p-DMAB) presente no reagente, sobre o triptofano existente na triptona.

Não foi observada reação positiva para os sobrenadantes das culturas crescidas em meio NFb.

A constatação de que o p-DMAB reagiu com o meio TYE devido à triptona, levou à conclusão de que o reagente de Ehrlich, o qual também possui p-DMAB em sua formulação, não foi suficientemente sensível, uma vez que não foi detectada reação positiva do reagente com o meio TYE.

O ensaio em que se utilizou o reagente de Salkowski mostrou-se o mais adequado para nossos objetivos. Após a adição do reagente de Salkowski aos sobrenadantes de culturas líquidas de *Azospirillum*, houve o aparecimento de uma coloração rósea. Essa coloração foi observada inicialmente em sobrenadantes da cultura da linhagem 703 Ebc de *A. brasilense* crescida em TYE e em meio NFb líquido suplementado com cloreto de amônio e triptofano. Não foi observada reação positiva (coloração rósea) nos frascos controle de nenhum dos meios de cultura.

O reagente de Salkowski foi, então, utilizado para os experimentos subsequentes por apresentar-se como o mais satisfatório dentre os testados, como já mencionado.

Para avaliação da produção de AIA foi feita uma curva padrão, medindo-se a absorbância a 530 nm da reação entre o reagente de Salkowski e soluções contendo diferentes concentrações de AIA. A curva obtida pode ser vista na Figura 2.

5-2-2-2- Efeito de diferentes concentrações de triptofano e cloreto de amônio na produção de AIA.

O efeito das concentrações de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) e triptofano no conteúdo de AIA presente nos sobrenadantes de culturas da estirpe 703 Ebc de *A. brasilense* pode ser visto na Figura 3. Os desvios observados em relação às médias foram muito pequenos não sendo possível a sua representação na escala do gráfico. O valor mínimo observado para o coeficiente de variação (CV) foi de 0,6% e o valor máximo foi de 1,3%.

Concentrações crescentes de triptofano (Trp), aumentaram a produção de AIA, independentemente da concentração de NH<sub>4</sub>Cl usada. Na ausência de NH<sub>4</sub>Cl, a bactéria foi capaz de produzir AIA, embora o aumento observado na produção, para níveis crescentes de triptofano tenha sido pequeno. Este fato pode ser devido à utilização do triptofano como fonte de nitrogênio para crescimento da bactéria, restando pouco para síntese de AIA. TIEN et al. (1979) reportaram que *A. brasilense* crescido em meio sem nitrogênio tinha seu crescimento acelerado quando triptofano era adicionado ao meio, indicando a utilização deste aminoácido como fonte de nitrogênio, pela bactéria.

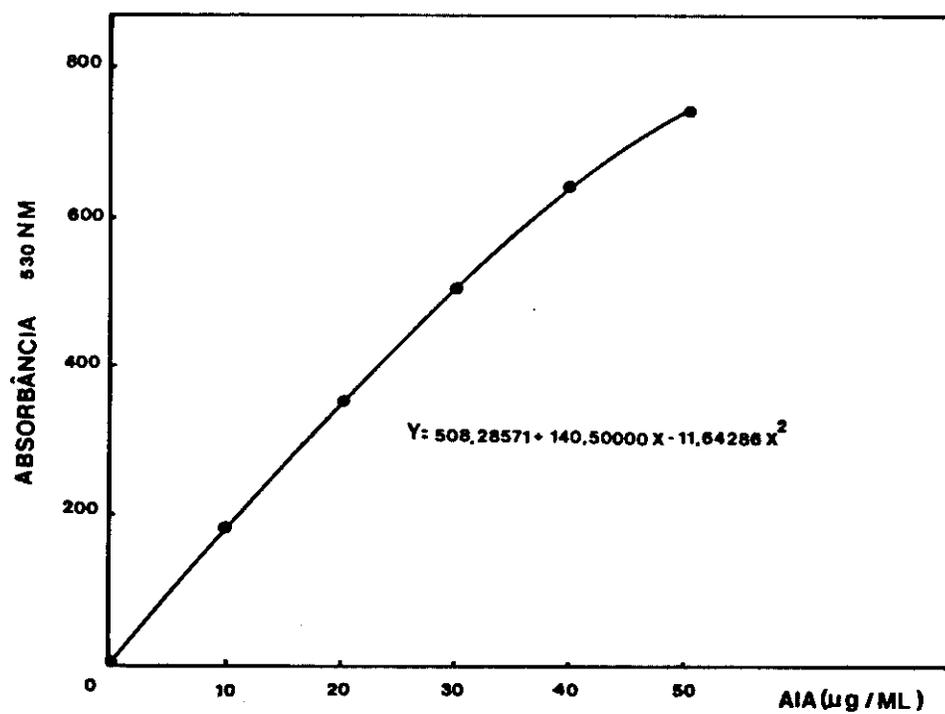


Figura 2- Curva padrão para ácido indol-acético (AIA).

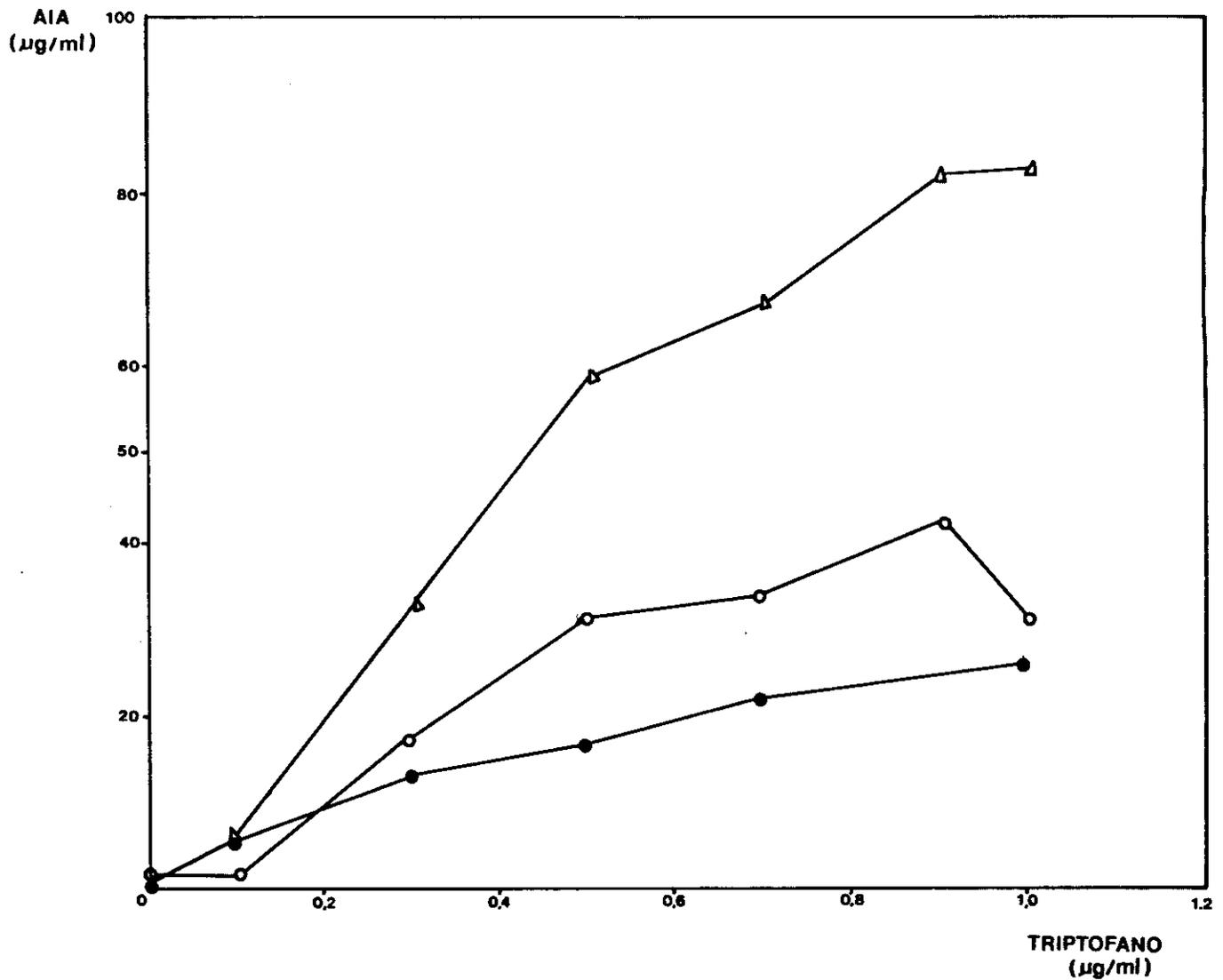


Figura 3- Efeito de diferentes concentrações de triptofano e NH<sub>4</sub>Cl na produção de AIA pela estirpe 703 Ebc de *A. brasilense*, quantificado pela reação com o reagente de Salkowski. Os traços indicam: ○—○ 10 mM NH<sub>4</sub>Cl; (△—△) 5 mM NH<sub>4</sub>Cl; ●—● 0 mM NH<sub>4</sub>Cl.

Dentre as concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  testadas, aquela que apresentou melhores resultados foi a de 5 mM. Observando a Figura 3, notamos que o aumento na produção de AIA, quando as diferentes concentrações de triptofano foram combinadas com 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , foi praticamente linear, até 0,9 mg de triptofano por ml de meio de cultura. A utilização de 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  na presença de triptofano, apresentou um efeito inibitório. SMALY & BERSHOVA (1957) e LEE et al. (1970) observaram que a produção de AIA por *Azotobacter vinelandii* foi reduzida na presença de nitrogênio fixado, sob condições de cultura estacionária e com agitação. Resultados parecidos foram encontrados por ROMANOW (1965) que reportou a inibição da síntese de AIA, a partir de triptofano, por culturas de *Azotobacter* em presença de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

5-2-2-3- Efeito do tempo de incubação e da concentração de triptofano na produção de AIA.

Os resultados da análise de sobrenadantes da estirpe 703 Ebc, a determinados intervalos de tempo, utilizando o reagente de Salkowski, para a produção de AIA, são mostrados nas Figuras 4 e 5. Nota-se que somente a partir de 9 horas de incubação é que foram observadas reações positivas com o reagente de Salkowski, indicando a produção de AIA. Aparentemente, o ponto máximo de produção é atingido após 18 horas e, em seguida, a produção começa a decrescer sofrendo uma diminuição vertiginosa em poucas horas. Isso parece ter sido ocasionado por esgotamento do substrato, o triptofano, uma vez que adicionando-se uma dose desse aminoácido, a qual elevaria sua concentração no meio para 200 ug/ml, a produção foi novamente ativada (Figura 4).

Na Figura 5 pode-se verificar que a concentração de triptofano alterou o perfil da produção de AIA. Para uma concentração de triptofano igual a 400 ug/ml, aumentou-se em 6 horas o período de produção que antecede ao ponto máximo. Entretanto, após atingir seu nível mais elevado, a produção diminuiu rapidamente.

Para 50 e 100 ug/ml de triptofano, a produção máxima foi atingida decorridas 18 horas de incubação, sendo que a queda de produção ocorrida após este período foi gradativa. Embora a produção máxima tenha sido atingida entre 21-24 horas para a concentração de 200 ug/ml de triptofano, observamos que o incremento na produção entre 18 e 21 horas não é da mesma ordem que o observado entre 12 e 18 horas.

Os valores de desvio padrão foram baixos, havendo homogeneidade dos dados obtidos. O coeficiente de variação máximo foi observado para a concentração de 400 ug/ml com valor igual a 12%. As demais concentrações apresentaram valores de CV bem mais baixos, sendo que o mínimo observado foi de 3%.

Para os experimentos subsequentes foi usada a concentração de 0,1 mg/ml de triptofano. Essa concentração tem sido reportada em vários experimentos para avaliação da produção de AIA (TIEN et al., 1979; HARTMANN et al., 1983; DE FRANCESCO, 1985), além de necessitar de um tempo de incubação relativamente curto para atingir o pico de produção e não apresenta queda drástica após este pico.

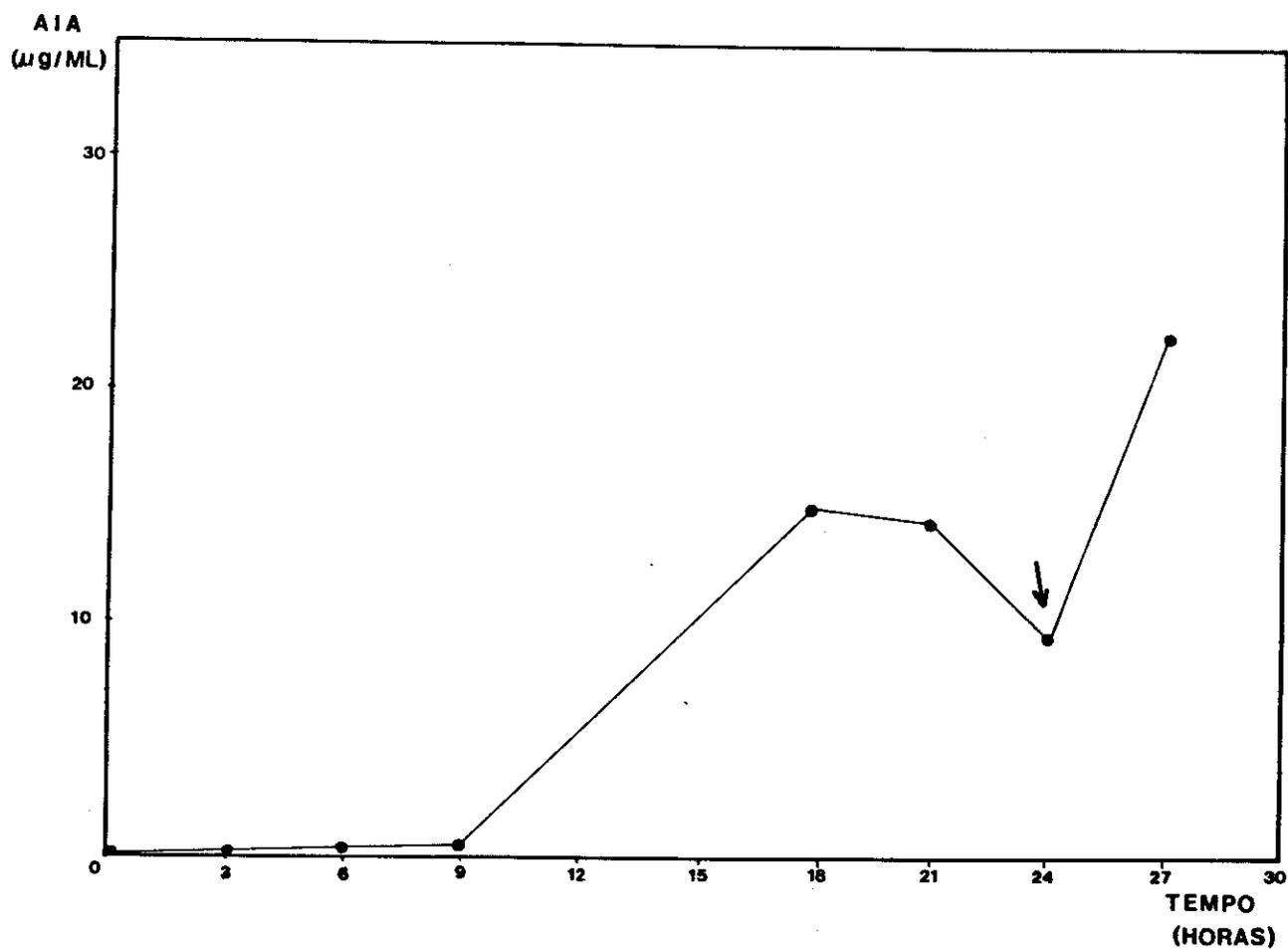
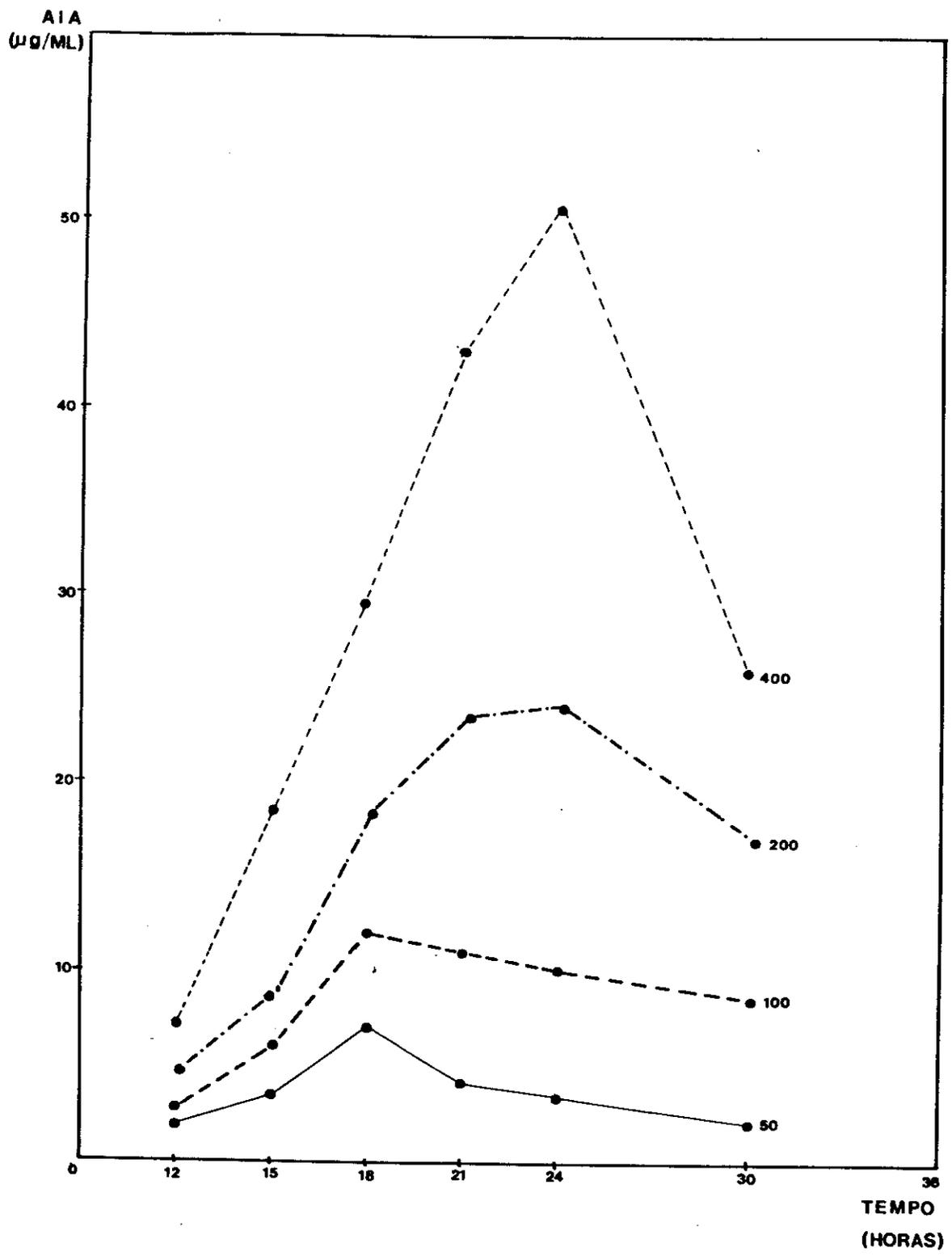


Figura 4- Efeito do tempo de incubação e concentração de triptofano na produção de AIA da estirpe 703 Ebc. A seta indica o momento em que foi feita a adição de triptofano (200 ug/ml).



5-2-2-4- Avaliação da produção de AIA pelas estirpes de *Azospirillum*.

Quando sobrenadantes das culturas de *Azospirillum* isolada de teosinte e de milho, foram submetidos à reação colorimétrica com o reagente de Salkowski, foi observada uma grande variação na produção de AIA pelas diferentes estirpes (Tabela 7). A maior parte das linhagens apresentou produção na faixa de 10 ug/ml. Apenas quatro estirpes não apresentaram produção detectável (reação negativa). Quatro linhagens de bactéria mostraram produção elevada - na faixa de 11 a 15 ug/ml, enquanto que a linhagem 703 Ebc apresentou uma produção de 27 ug/ml. Esses dados estão de acordo com aqueles reportados por HARTMANN et al. (1983) para culturas de mutantes de *Azospirillum*, usando a mesma metodologia. HOREMANS et al. (1986) também reportaram quantidades semelhantes para estirpes de *Azospirillum*, em presença de 0,1 mg/ml de triptofano. Eles detectaram, entretanto, algumas estirpes, pertencentes a *A. brasilense*, com produção bem mais alta, na faixa de 50 a 60 ug/ml.

Tabela 7- Estimativa da produção de ácido indol-acético AIA por estirpes de *Azospirillum* isoladas de teosinte e milho, utilizando-se o reagente de Salkowski.

Estirpes de Bactéria	Produção de AIA (ug/ml)
<b><i>A. lipoferum</i></b>	
101 Rd	3,00 ± 0,17
401 Rc	1,56 ± 0,01
401 Rd	9,17 ± 0,33
501 Ra	5,83 ± 0,22
701 Rd	4,33 ± 0,11
202 Rb	4,00 ± 0,17
502 Rb	14,00 ± 0,10
702 Ra	0,00
702 Rd	0,00
902 Ra	3,89 ± 0,11
902 Rd	0,83 ± 0,06
504 Ea	7,00 ± 0,11
704 Ed	
<b><i>A. brasilense</i></b>	
601 Rc	0,00
901 Ra	15,50 ± 0,33
802 Ra	3,39 ± 0,17
303 Ea	1,33 ± 0,06
703 Ebc	27,00 ± 0,11
803 Ed	4,95 ± 0,21
903 Rd	14,50 ± 0,22
204 Ed	10,89 ± 0,72
404 Ed	0,00
904 Ed	8,44 ± 0,17

Produção de AIA em níveis semelhantes àqueles mostrados na Tabela 7, para algumas das estirpes, entre 1,0 e 10,0 µg/ml, foi reportada por BROWN (1972) para bactérias isoladas de raízes de trigo. As estimativas foram feitas para culturas crescidas na presença de 100 mg de triptofano por litro de meio de cultura. O método de quantificação empregado foi o de bio-ensaio, medindo-se o alongamento de coleoptiles de trigo.

Não foi possível estabelecer correlação entre os níveis de produção de AIA pelas estirpes de bactéria e o material vegetal do qual foram isoladas.

### 5-3- Quantificação e Metabolismo do AIA por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).

5-3-1- Análise qualitativa dos indóis produzidos por *Azospicillum* utilizando-se HPLC e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

Os cromatogramas obtidos com as amostras de *Azospicillum* estão ilustrados na Figura 6. O extrato básico continha três picos fluorescentes: um primeiro desconhecido; um componente principal que co-cromatografou com o precursor do AIA, indol-etanol (IET), e um constituinte com maior tempo de retenção que co-cromatografou com o indol-

metanol (IM), Figura 6a. O principal pico ácido, em acetato de etila, co-cromatografou com AIA enquanto um dos constituintes em menor quantidade, eluído antes do AIA, co-cromatografou com o ácido indol-láctico (ILA), Figura 6b. Os tempos de retenção dos outros três picos fluorescentes no extrato ácido, não corresponderam àqueles de quaisquer outros padrões disponíveis para indóis.

Os espectros de massa obtidos, correspondentes aos picos indólicos, estão resumidos na Tabela 8 e confirmam as identificações de IET, IM, AIA e ILA, baseadas na análise por HPLC.

5-3-2- Análise de AIA de cultura de *Azospicillum* por HPLC, usando o método de diluição isotópica.

Embora AIA tenha sido identificado por GC-MS como um constituinte endógeno da estirpe 703 Ebc de *A. brasilense*, estimativas quantitativas baseadas na análise por HPLC com fluorescência indicaram, usando diluição isotópica, que o nível de AIA no meio de cultura era 2-3 vezes menor em ordem de magnitude do que aqueles medidos pelo reagente de Salkowski (Tabela 7).

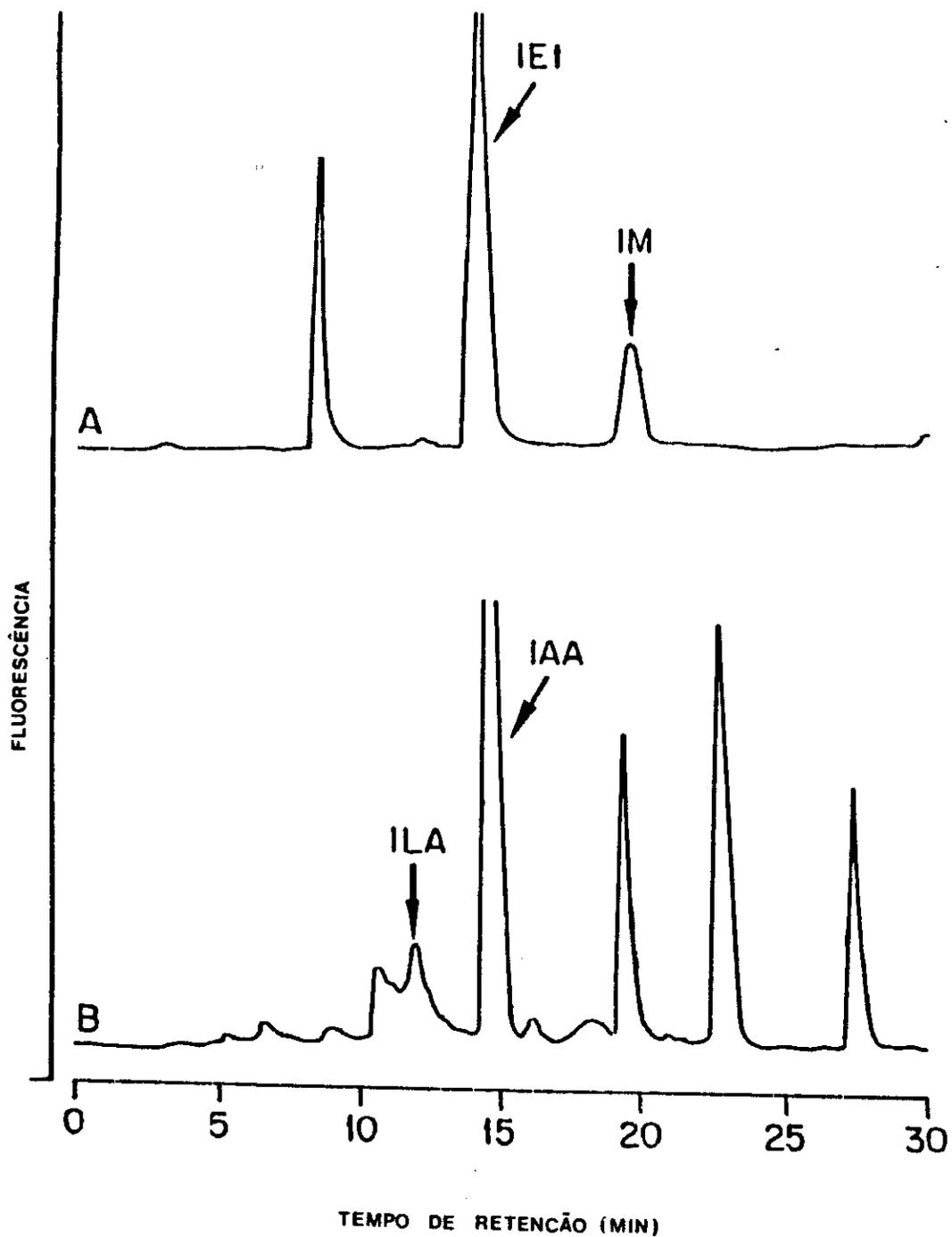


Figura 6- Análise dos indóis presentes no sobrenadante da cultura 703 Ebc de *Azospirillum brasilense*, por HPLC de fase reversa; amostra: A- Alíquota 1/1000 do extrato básico em ETOAc; B- Alíquota 1/1000 do extrato ácido em ETOAc.

Os extratos acídicos foram primeiramente submetidos a HPLC de fase normal. As Figuras 7A e 7C mostram os cromatogramas obtidos. Ambas amostras continham grandes quantidades de impurezas absorvendo UV e, embora não houvesse nenhum pico de AIA aparente, as zonas do AIA foram coletadas e analisadas em HPLC de fase reversa. O principal componente em ambos os traços obtidos por fase reversa apresentaram um pico, o qual co-cromatografou com o AIA (Figura 7B e 7D).

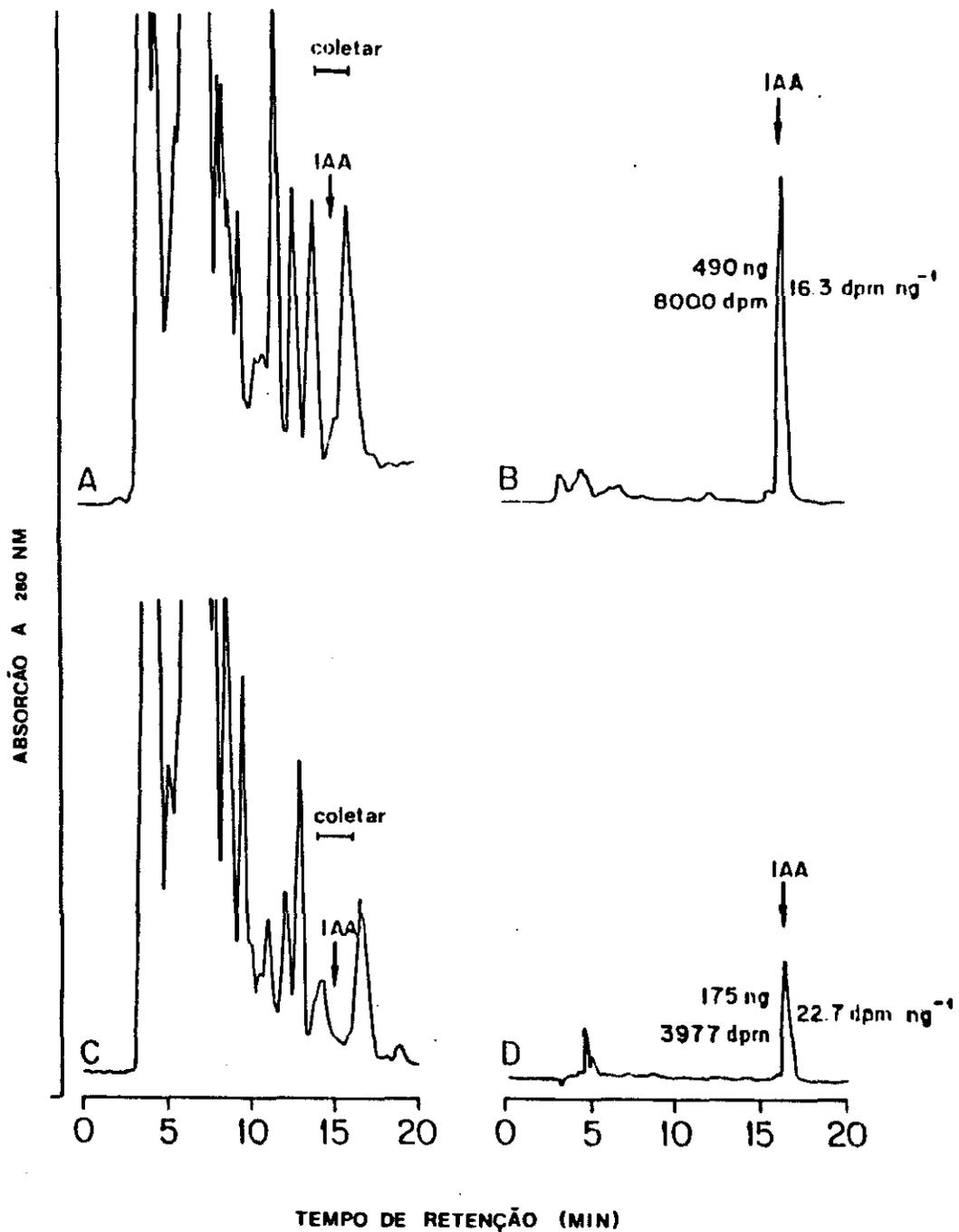


Figura 7- Análise por HPLC da diluição isotópica do AIA no sobrenadante da culturas das estirpes 703 Ebc (traços A e B) e da estirpe 404 Ed (traços C e D) de *A. brasilense*. [2'-<sup>14</sup>C]-AIA foi adicionado ao sobrenadante como padrão interno e os extratos acídicos em dietil eter foram purificados por HPLC de fase normal (traços A e C) antes da análise por HPLC de fase reversa (traços B e D).

Tabela 8- Espectro de massa das frações de HPLC trimetilsililadas dos extratos básico e ácido em acetato de etila obtido para o sobrenadante da cultura 703 Ebc de *A. brasilense*.

Pico por HPLC	Espectro de Massa m/z (% intensidade)	Identidade
IET	[M+ ]305(15), 290(4), 216(8), 202(100)	IET-TMS2
IM	[M+ ]291(100), 276(7), 202(60)	IM-TMS2
AIA	[M+ ]319(40), 202(100), 130(12), 129(9)	AIA-TMS2
ILA	[M+ ]421(5), 406(4), 378(3), 304(3), 202(100)	ILA-TMS2

A quantidade de AIA presente nas duas amostras foi determinada tendo como referência uma curva padrão de picos com absorvância a 280 nm. A radioatividade associada aos picos de AIA foi estimada utilizando-se um cintilômetro.

A quantidade real de AIA (Y), considerando as perdas durante o processo de extração e purificação, foi então calculada com a equação de Rittenberg e Foster (1940), para diluição isotópica,  $Y = (Ci/Cf) - 11 X$ , onde X = quantidade de padrão interno adicionada à amostra; Ci = atividade específica do padrão interno e Cf = atividade específica do padrão interno depois da diluição com o AIA endógeno. Os dados obtidos mostram que o sobrenadante da estirpe 703 Ebc continha 110 ng de AIA por ml e aquele da estirpe 404 Ed continha 76 ng/ml.

O conteúdo de AIA da estirpe 703 Ebc é de interesse particular uma vez que é bem menor do que aquele obtido com o reagente de Salkowski (Tabela 7). Isto sugere que quando o método colorimétrico é usado para analisar os sobrenadantes, altas estimativas da produção de AIA podem ser obtidas. Na realidade, há várias publicações nas quais estimativas de 10-30 ug/ml em sobrenadantes de cultura de *Azospirillum* foram obtidas com o reagente de Salkowski (HARTMANN et al., 1983).

Da mesma forma, estimativas do conteúdo de AIA de culturas de *A. brasilense* têm sido reportadas, com base na análise de extratos acídicos, em acetato de etila, por HPLC com um monitor de absorvância como detector (TIEN et al., 1979; DE FRANCESCO et al., 1985). O nível de impurezas nas amostras e a falta de seletividade do detector torna

provável a existência de contaminantes que podem ter sido tomados por AIA nesses estudos. Este seria o caso em nossos estudos, se as estimativas do conteúdo de AIA tivessem sido baseadas somente nos resultados da análise por HPLC inicial (Figuras 7a e 7c), em vez de basearem-se na sequência analítica (Figuras 7b e 7d) por HPLC.

Estimativas mais confiáveis são obtidas em uma única análise por HPLC quando um fluorímetro é usado como detector, em vez de um monitor de absorvância (SANDBERG et al., 1987). A seletividade oferecida por um fluorímetro na análise de AIA e indóis relacionados é evidente quando comparamos os cromatogramas da Figura 6 com aqueles das Figuras 7a e 7c.

Os dados mais confiáveis sobre os níveis de AIA produzidos por *Azospicillum* são aqueles reportados por HOREMANS & VLASSAK (1985). Esses investigadores usaram um detector de fluorescência e analisaram amostras com HPLC de fase reversa com pareamento de íons e supressão de íons. Níveis de AIA de 40 ng/ml foram detectados e as estimativas foram confirmadas por análise ulterior usando o ensaio com 2-metilindol-pirona. O nível de AIA por eles detectado é um pouco mais baixo do que aqueles detectados em nossos experimentos. Isso pode ser devido às diferentes condições de crescimento da bactéria e às estirpes usadas. Ou ainda ao fato de HOREMANS & VLASSAK não terem usado padrão interno para verificar as perdas. É interessante notar que esses resultados estão de acordo com aqueles reportados para culturas de *Rhizobium* crescidas em meio suplementado com quantidades semelhantes de triptofano (WANG et al., 1982; ERNSTSEN et al., 1987).

5-3-3- Metabolismo do AIA em *Azospirillum* e em raízes de milho inoculadas e não inoculadas com a bactéria.

Os cromatogramas de HPLC com monitor de radioatividade (HPLC-RC) estão expostos na Figura 8A e 8C.

Um dos metabólitos do AIA marcado produzido por *Azospirillum* teve o mesmo tempo de retenção que o IM no sistema de HPLC de fase reversa (Figura 8A).

O metabolismo do [2'-<sup>14</sup>C]- AIA de raízes de milho foi bem mais complexo, dando origem a vários produtos polares, um dos quais teve as mesmas propriedades de retenção que o ácido oxindol-acético (OxIA), Figura 8B. Um perfil semelhante foi obtido para as raízes de milho inoculadas com *A. brasilense* (Figura 8C). As setas na figura indicam os tempos de retenção do AIA e OxIA. Isto indica que o milho está fazendo a contribuição predominante para o catabolismo do AIA nas raízes infectadas. Os dados, entretanto, não indicam se a fonte principal de AIA nas raízes é de origem bacteriana ou vegetal.

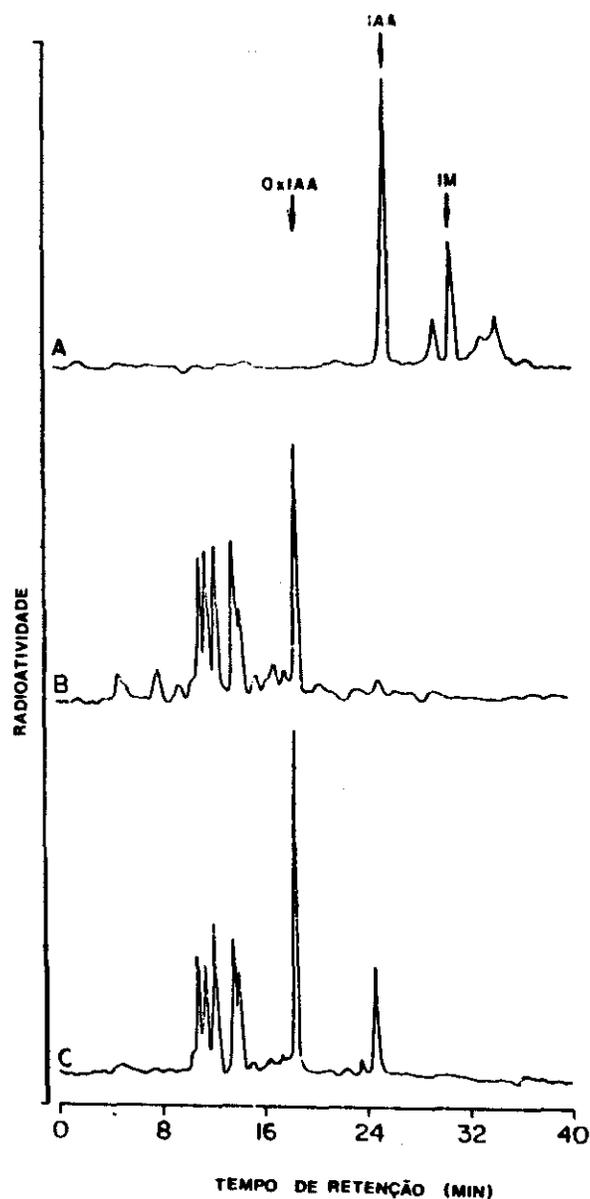


Figura 8- Análise por HPLC de fase reversa os metabólitos do [2'-14C] AIA produzidos por: A) estirpe 703 Ebc de *A. brasilense*; B) raízes de milho e C) raízes de milho inoculadas com a estirpe 703 Ebc. Coluna: 250 x 5 mm i.d. 5  $\mu$ m ODS Hypersil. Fase móvel: 0-25 min, 15-55% metanol em 0,5% ácido acético. Fluxo 1 ml/min. Detector: monitor analítico de radioatividade Reeve com operação homogênea (SANDBERG et al., 1987).

5-4- Efeito da adição de diferentes nutrientes ao meio de cultura para o crescimento de *Azospicillum*.

Foram realizados ensaios com a finalidade de determinar uma metodologia adequada à verificação dos efeitos da adição de diferentes extratos de raízes no crescimento da bactéria.

5-4-1- Método da Placa Gradiente.

A utilização de placas-gradiente para a detecção de um fator limitante para o crescimento das bactérias mostrou-se ineficiente.

Os ensaios iniciais feitos com a utilização de meio NFb + 20 mg /l extrato de levedura e ágar-água, mostraram que as colônias de bactéria cresciam de maneira eficiente mesmo nas regiões da placa em que os nutrientes encontravam-se muito diluídos.

5-4-2- Método da Placa com Orifício.

Com o mesmo objetivo do ensaio anterior foram realizados testes em placa com orifício, entretanto esta técnica também apresentou problemas.

Após o período de incubação necessário para o crescimento das colônias, as placas foram avaliadas. Foi observado crescimento de

*Azospirillum* em todos os meios utilizados, exceto para o tratamento em que omitiu-se todos os nutrientes adicionais.

Devido aos problemas encontrados, resolvemos não mais utilizar meio sólido no qual a avaliação visual dos resultados é mais sujeita a erros.

#### 5-4-3- Método da Curva de Crescimento em Meio Líquido.

Seis linhagens de *Azospirillum* foram selecionadas para serem utilizadas nos experimentos de avaliação de genótipos de milho, além de duas linhagens-padrão (Sp7, de *A. brasilense* e 204 b, de *A. lipoferum*). As linhagens foram selecionadas de acordo com a espécie e sensibilidade aos antibióticos. As linhagens selecionadas foram: 401 Rd, 702 Rd, 704 Ed, pertencentes à espécie *A. lipoferum* e 703 Ebc, 903 Rd e 404 Ed pertencentes a *A. brasilense*. Com exceção da linhagem 704 Ed, todas apresentaram boa resistência aos antibióticos testados (Tabela 6). A estirpe 704 Ed foi selecionada por ter sido purificada com grande facilidade, apresentando culturas puras desde a primeira passagem em meio sólido.

As Figuras de 9 a 16 mostram as curvas de crescimento obtidas para cada linhagem.

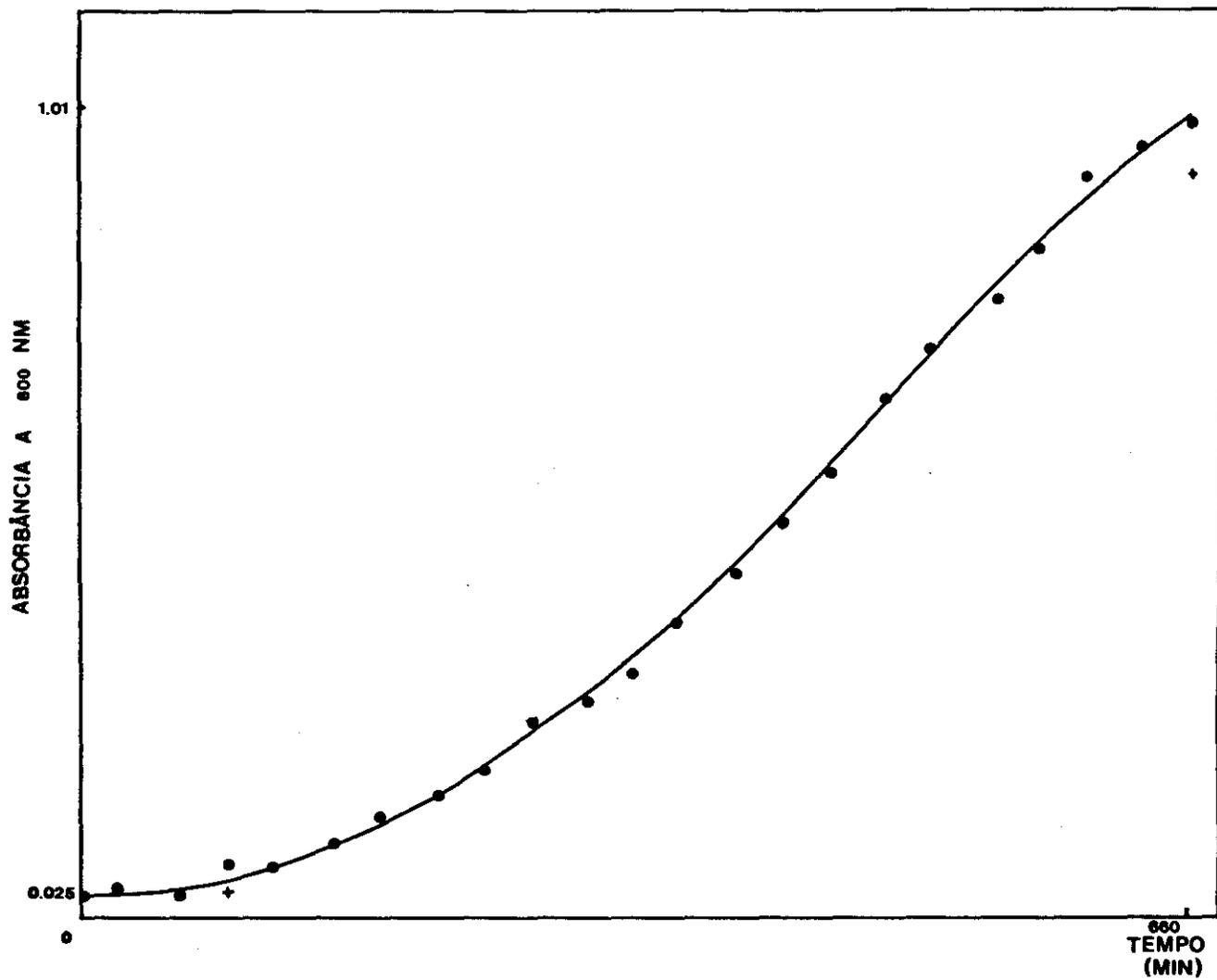


Figura 9- Curva de crescimento para a estirpe Sp7 de *Azospirillum brasilense* em meio NFb líquido.

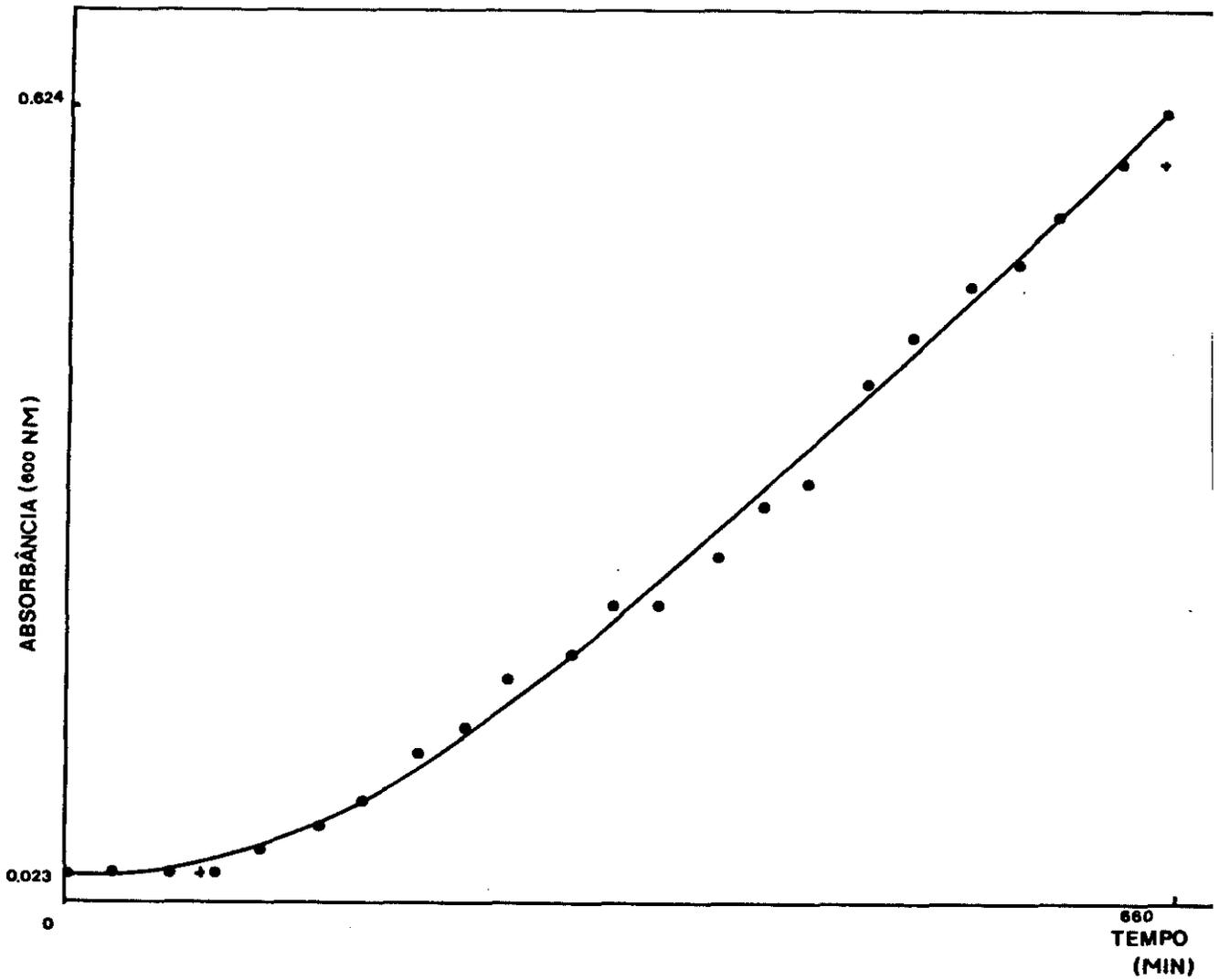


Figura 10- Curva de crescimento da estirpe 204 b de *Azospicillum lipoferum* em meio NFb líquido.

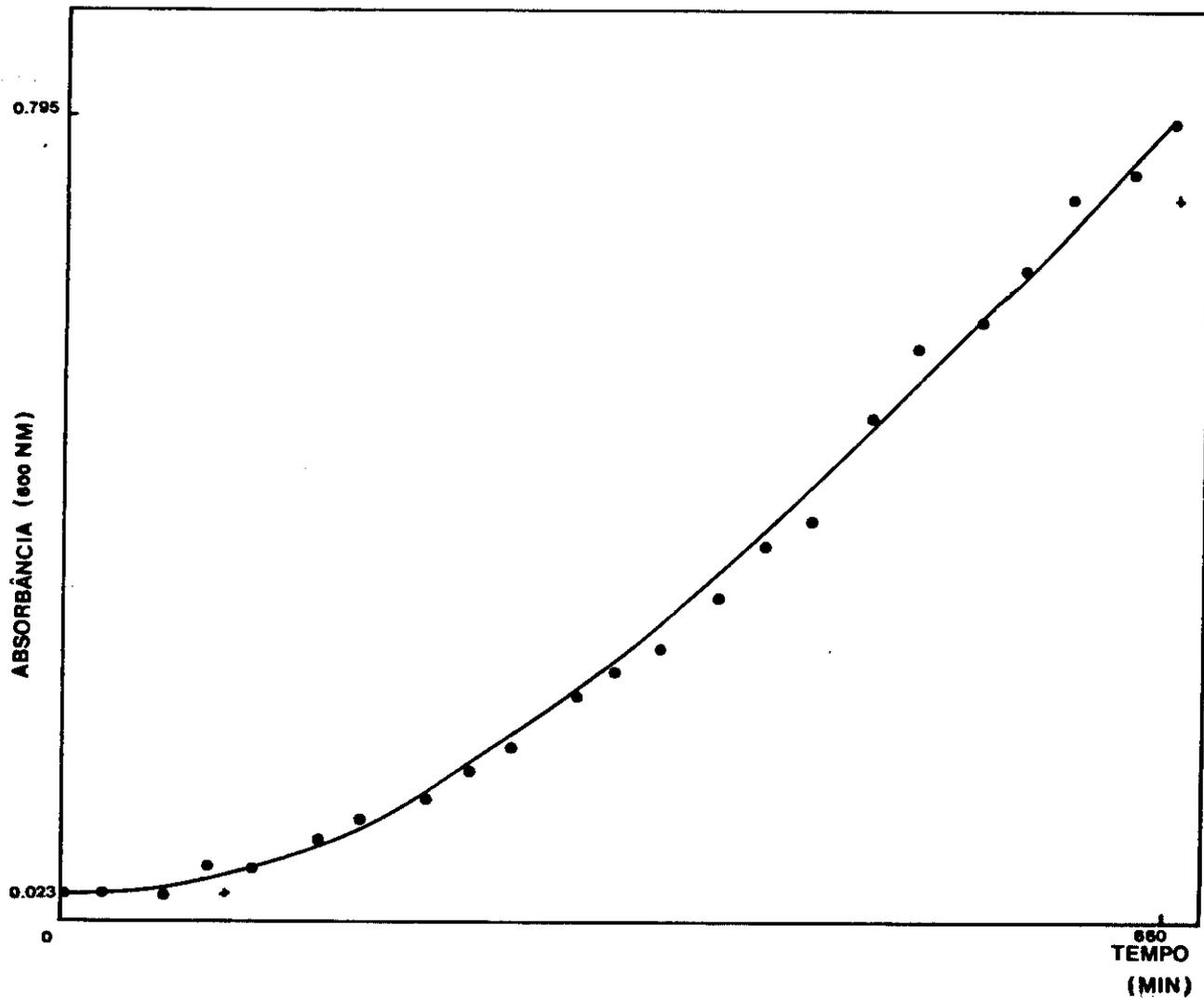


Figura 11- Curva de crescimento da estirpe 401 Rd de *Azospirillum lipoferum* em meio NFB líquido.

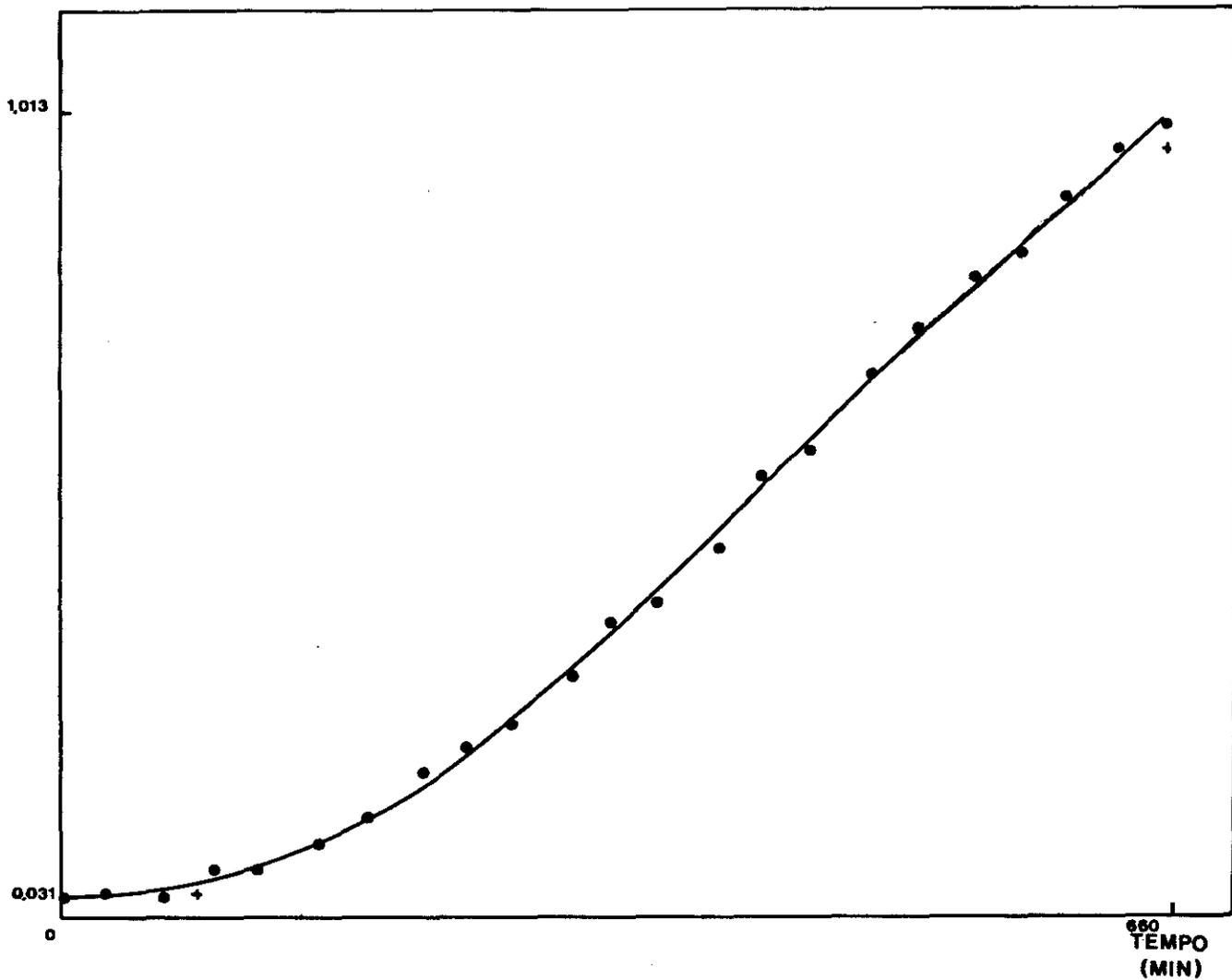


Figura 12- Curva de crescimento da estirpe 702 Rd de *Azospirillum lipoferum* em meio NFb líquido.

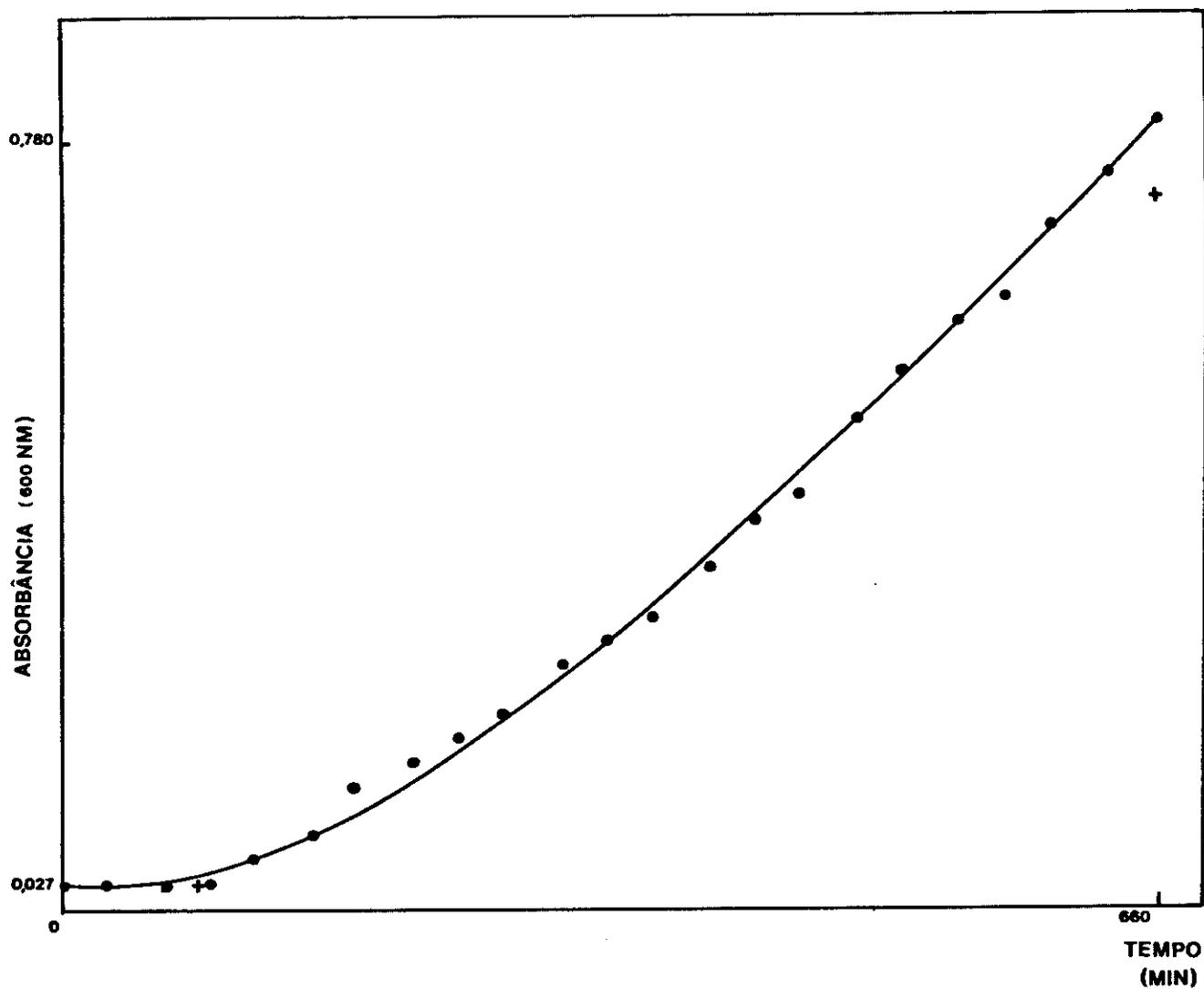


Figura 13- Curva de crescimento da estirpe 704 Ed de *Azospirillum lipoferum* em meio Nfb líquido.

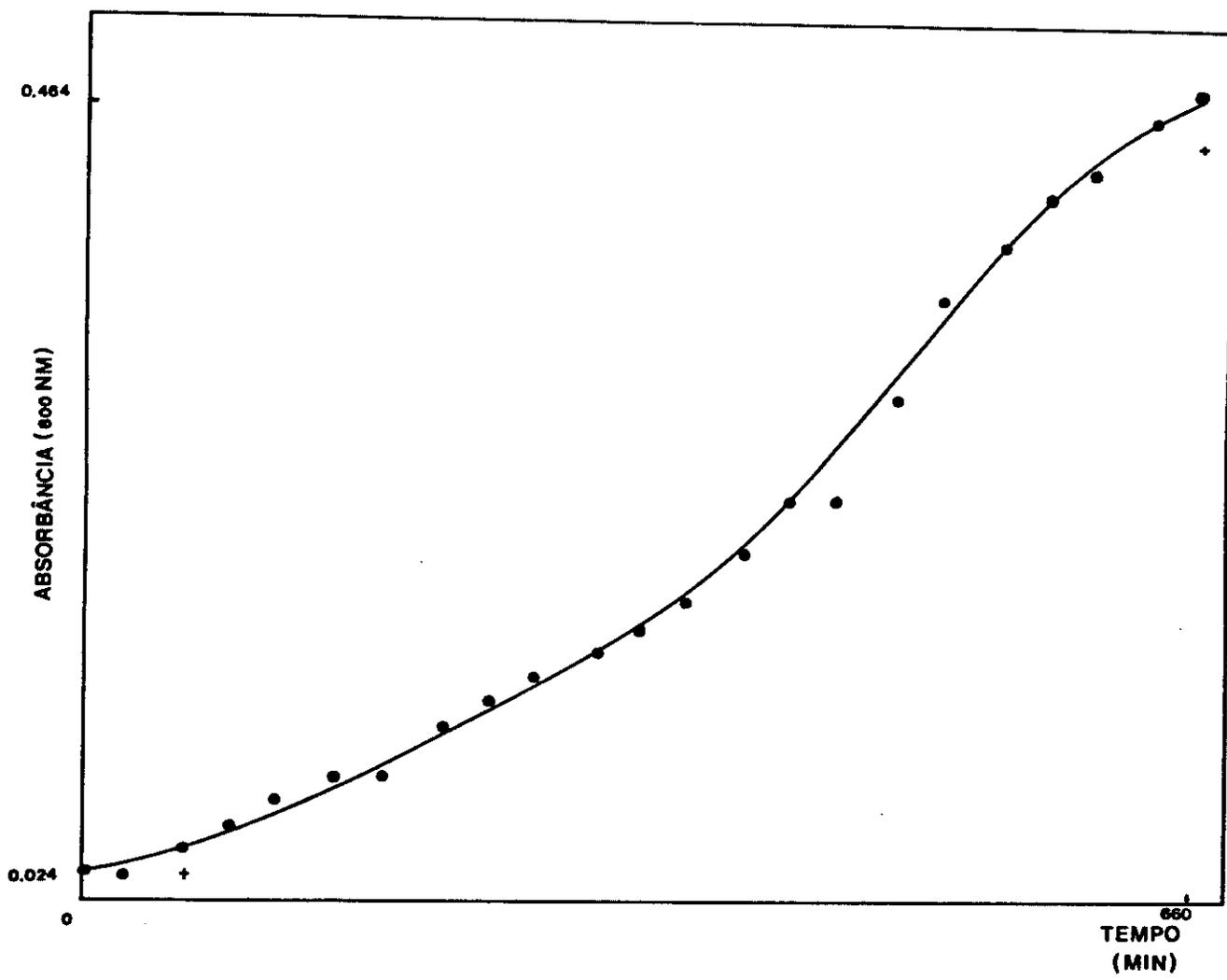


Figura 14- Curva de crescimento da estirpe 703 Ebc de *Azospirillum brasilense* em meio NFb líquido.

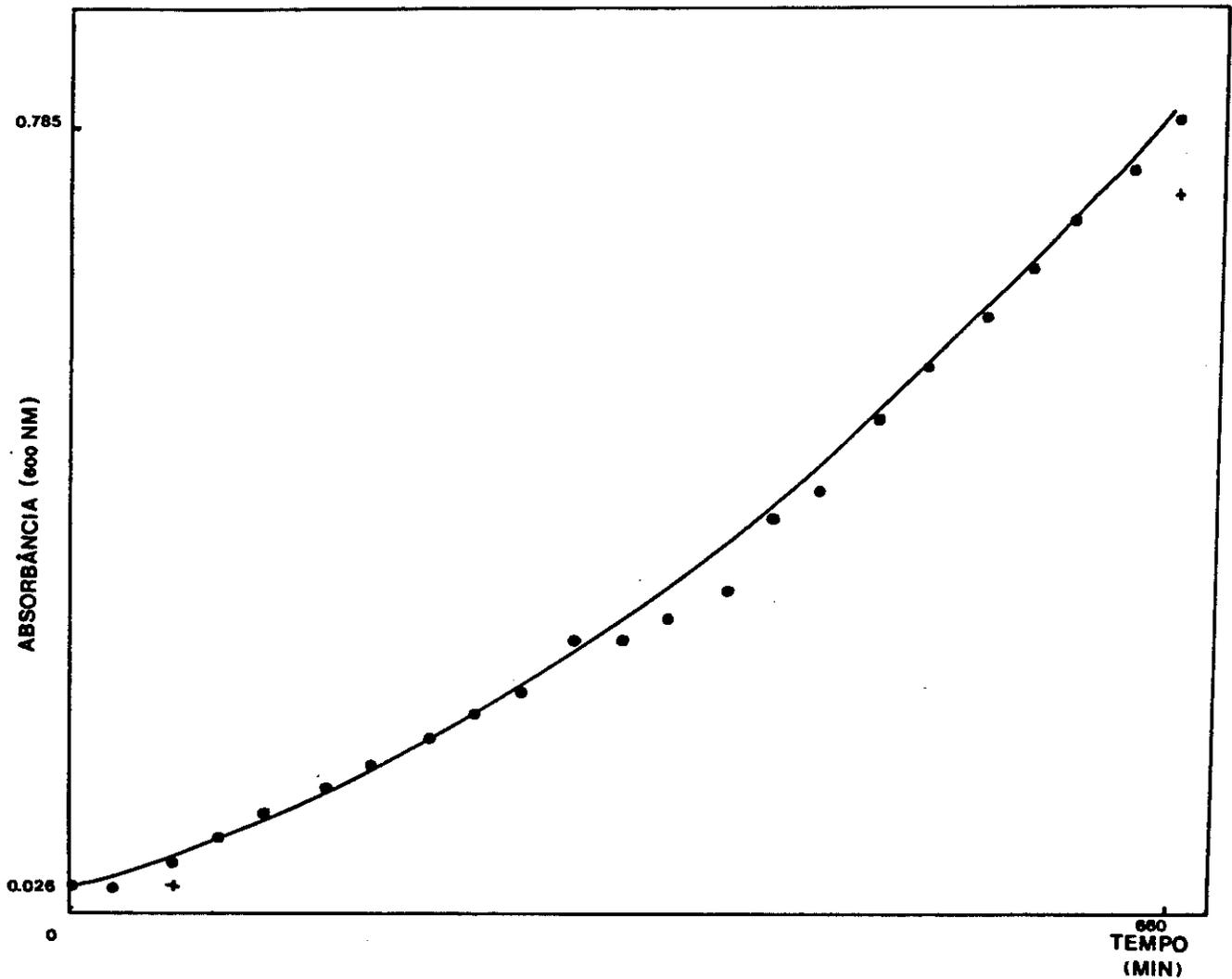


Figura 15- Curva de crescimento da estirpe 903 Rd de *Azospirillum brasilense* em meio Nfb líquido.

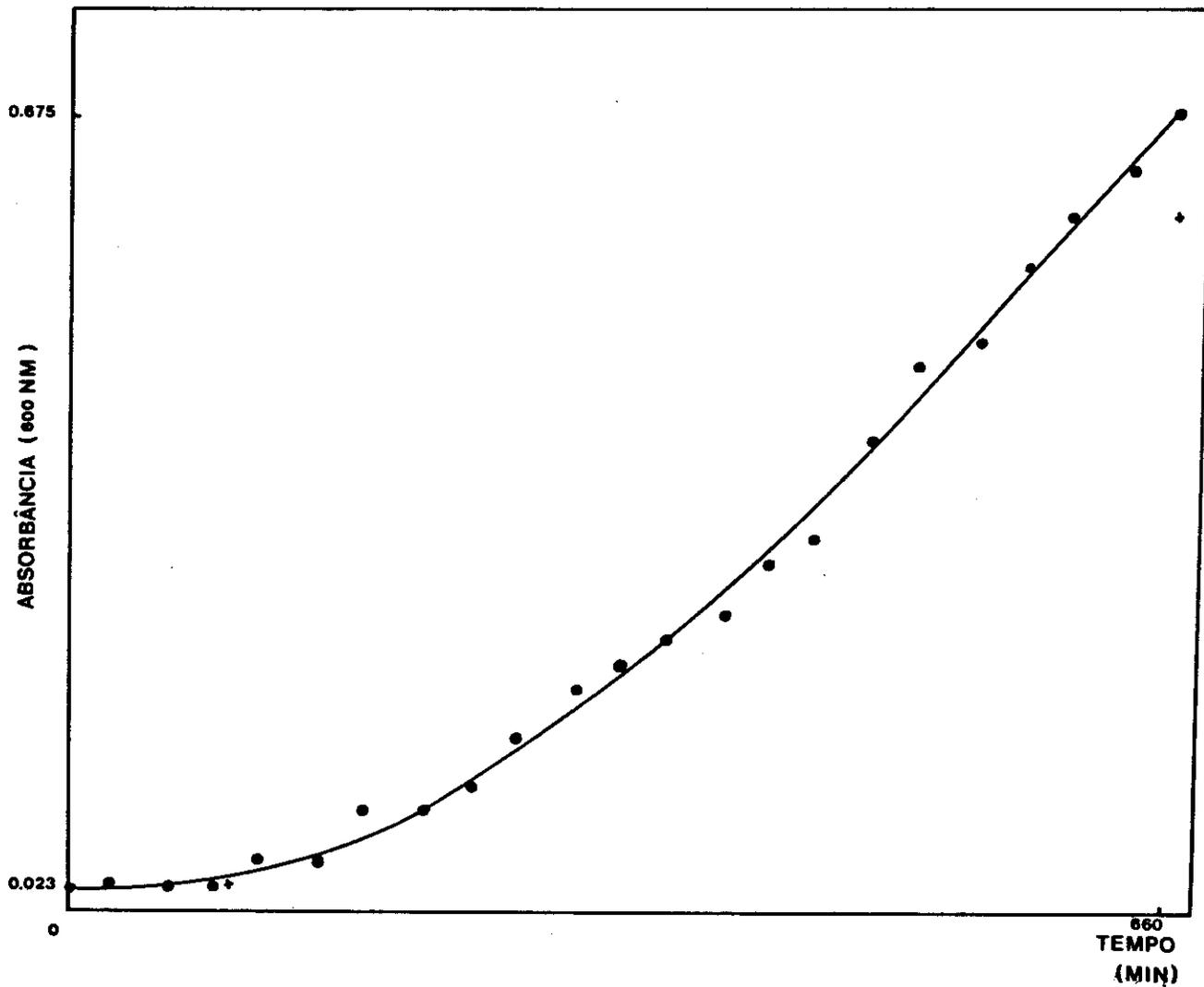


Figura 16- Curva de crescimento da estirpe 404 Ed de *Azospicillum brasiliense* em meio NFB líquido.

As linhagens foram comparadas com cada uma das estirpes-padrão para verificação de diferenças no padrão de crescimento. Os resultados podem ser vistos na Tabela 9, onde são mostrados os valores de F, coeficiente angular (b), e altura (a), das retas de regressão com os respectivos valores de t para b e a.

Observamos, mais uma vez, a existência de uma grande variabilidade entre as estirpes de *Azospirillum*, com diferenças significativas entre as variâncias, coeficientes angulares e alturas.

A análise dos coeficientes de correlação demonstra que apesar da existência de diferenças significativas entre as curvas de crescimento das estirpes de *Azospirillum* é possível estabelecer um coeficiente de correlação médio. Isto indica que o grau de dispersão dos dados de cada linhagem em relação à retas de regressão é o mesmo, ou seja, que os dados são homogêneos quanto à correlação.

Na Tabela 10 são mostrados os valores de regressão e correlação, com o valor de  $r = 0,9801$  sendo altamente significativo ( $t = 62,649$ ) ao nível de 5 e de 1% de probabilidade para 161 graus de liberdade.

Tabela 9- Comparação entre o crescimento das linhagens de *Azospicillum* isoladas de teosinte e de milho e das linhagens Sp7, de *A. brasilense*, e 204 b, de *A. lipoferum* - Teste de duas retas de regressão.

Linhagem padrão	Linhagem testada	Parâmetros Testados				
		F	b	t	a	t
Sp7	204 b	4,42*	0,058	7,96*	-0,0600	-
	401 Rd	1,55	0,075	0,38	-0,1025	5,52*
	702 Rd	1,49	0,098	0,01	-0,1076	4,64*
	704 Ed	2,52*	0,071	5,09*	-0,0765	-
	703 Ebc	5,82*	0,042	11,32*	-0,0264	-
	903 Rd	2,72*	0,070	5,33*	-0,0570	-
	404 Ed	1,97	0,062	0,60	-0,0830	2,76
204 b	Sp7	4,42*	0,099	7,96*	-0,1355	-
	401 Rd	0,29	0,075	0,35	-0,1025	9,77*
	702 Rd	2,97*	0,098	9,09*	-0,1076	-
	704 Ed	1,76	0,071	0,09	-0,0765	0,19
	703 Ebc	1,32	0,042	0,48	-0,0264	3,45*
	903 Rd	0,61	0,070	0,30	-0,0570	6,72*
	404 Ed	2,25	0,062	1,00	-0,0830	19,55*

\* valores significativos ao nível de 5 e de 1%.

Tabela 10- Coeficientes de regressão ( $r^2$ ) e correlação (r) das curvas de crescimento das estirpes de *Azospirillum*.

---

Linhagens de <i>Azospirillum</i>	r	$r^2$
Sp7	0,9774	0,9554
204 b	0,9851	0,9704
401 Rd	0,9745	0,9496
702 Rd	0,9844	0,9691
704 Ed	0,9826	0,9655
703 Ebc	0,9782	0,9569
903 Rd	0,9835	0,9672
404 Ed	0,9709	0,9427

---

5-5- Efeito da adição de diferentes extratos vegetais no crescimento de *Azospirillum*.

As curvas de crescimento da linhagem Sp7, de *Azospirillum* brasileira em meio contendo extratos de raízes do milho híbrido simples F1 1227 e de uma Linhagem de Milho Americano, demonstram a existência de diferenças entre os materiais vegetais utilizados.

As curvas obtidas em extratos de raízes de plântulas com 20 e 30 dias, pela análise dos quadrados mínimos, são mostradas nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

Em ambos os casos, extratos de raízes do híbrido F1 1227 apresentaram maior estímulo ao crescimento da bactéria do que os extratos de raízes da Linhagem Americana. Os extratos de raízes de 30 dias mostraram uma maior diferença entre si, indicando que o teor da substância, ou substâncias, estimuladora do crescimento bacteriano pode ter aumentado, com o tempo, com mais intensidade nas plântulas do híbrido do que nas plântulas da linhagem.

Pela observação das curvas, nota-se que os pontos para os extratos do híbrido apresentaram uma dispersão ligeiramente maior em relação aos pontos das curvas obtidas com os extratos da linhagem. Entretanto, essa maior dispersão diminui sensivelmente à medida que aumenta o efeito estimulante causado pelo extrato do híbrido (Figura 18). Além disso, verifica-se que aos 30 dias, a diferença entre os efeitos causados pelos materiais vegetais foi duplicada. Nota-se ainda uma con-

sistência entre os padrões das curvas aos 20 e 30 dias.

A maior concentração do(s) princípio(s) estimulante(s) no híbrido poderia ser devida à heterose, enquanto que a Linhagem teria um teor mais baixo devido, possivelmente, à endogamia. A heterose explicaria o teor mais elevado do princípio ativo pelo acúmulo, no híbrido, de genes dominantes provenientes de ambos os pais, ou pela condição heterozigótica dos loci que controlam o caráter, tornando o heterozigoto superior a qualquer um dos homozigotos (sobredominância). Por outro lado, a Linhagem, obtida por um processo de endogamia, apresentaria um fenômeno inverso à heterose (MIRANDA FILHO & VIEGAS, 1987) e, portanto, uma concentração mais baixa da substância estimulante.

Uma outra hipótese seria que o material de clima tropical, o F1 1227 teria uma maior capacidade de produção da substância em questão por ter sido melhorado em regiões tropicais, onde as temperaturas do solo são adequadas ao crescimento de plantas e atividade microbiana durante a maior parte do ano (DOBEREINER et al., 1976). Assim, poderia ter ocorrido uma seleção concomitante, embora não intencional, de plantas com características desejáveis para desenvolvimento do híbrido e com teores mais altos, em suas raízes ou outras partes da planta, de substâncias atrativas aos microrganismos benéficos. ELA et al. observaram que, em experimentos de inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio, aquelas que possuíam pelo menos um dos pais proveniente da América Central ou do Sul, apresentaram atividade de redução de acetileno, enquanto que materiais desenvolvidos em regiões centrais dos Estados Unidos não se comportaram da mesma forma.

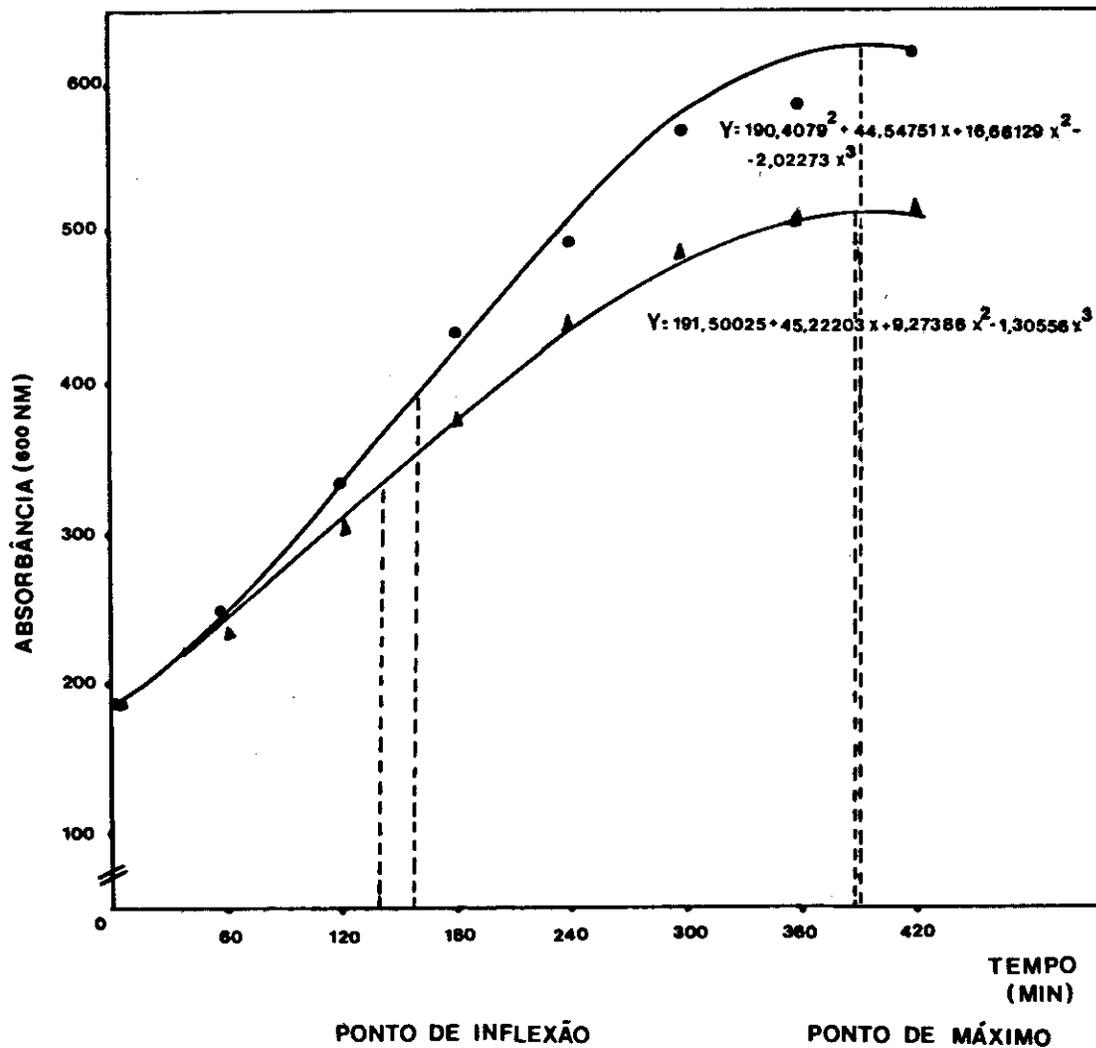


Figura 17- Curva de crescimento da estirpe Sp7 de *Azospirillum brasilense* em extratos de raízes de plântulas de milho com 20 dias: (●—●) híbrido simples F1 1227; (▲—▲) Linhagem Americana.

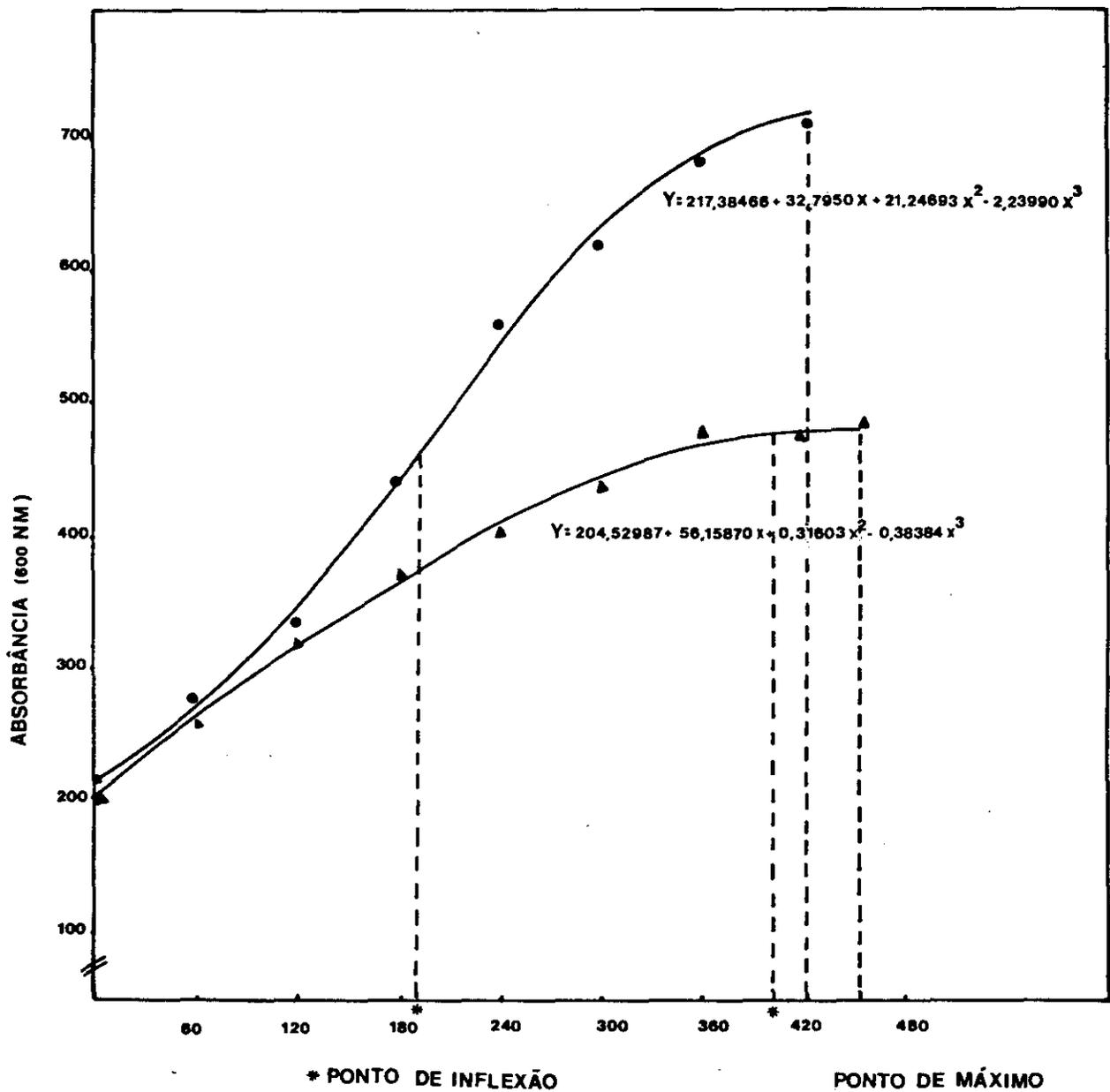


Figura 18- Curva de crescimento da estirpe Sp7 de *Azoseiillum brasilense* em extratos de raízes de plântulas de milho com 30 dias: (●—●) híbrido simples F1 1227; (▲—▲) Linhagem Americana.

5-6- Efeito da inoculação de diferentes genótipos de milho com diferentes estirpes de *Azospirillum*.

5-6-1- Efeito de diferentes concentrações de inoculante no crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva.

A Figura 19 mostra o comportamento dos dois híbridos de milho quando inoculados com diferentes concentrações das estirpes 703 Ebc e 404 Ed de *A. brasilense*. Pode ser observado que os dois materiais vegetais apresentaram comportamentos bastante distintos. O F1 [910 (BC2/10 39) X 1005 (BC2/897)] Dentado apresentou um aumento no seu comprimento radicular quando inoculado com diferentes concentrações de ambas as estirpes bacterianas, enquanto que o F1 [903 (BC2/910) X 922] Cateto mostrou uma redução do seu comprimento radicular. A Figura 19 mostra ainda diferenças entre o grau de inibição e/ou estímulo no crescimento das raízes causado pelas duas estirpes de bactéria. O CV mínimo observado foi de 3% e o máximo foi igual a 5%.

Na Tabela 11 são mostradas as médias conjuntas do crescimento das raízes dos dois híbridos de milho para as diferentes concentrações de inoculantes. Foram encontradas diferenças significativas entre as médias. A média mais alta foi observada para a concentração 0,25% de inoculante e a mais baixa foi verificada para a concentração de 0,5%. Estes resultados entretanto não levam em consideração as interações mostradas na Figura 19.

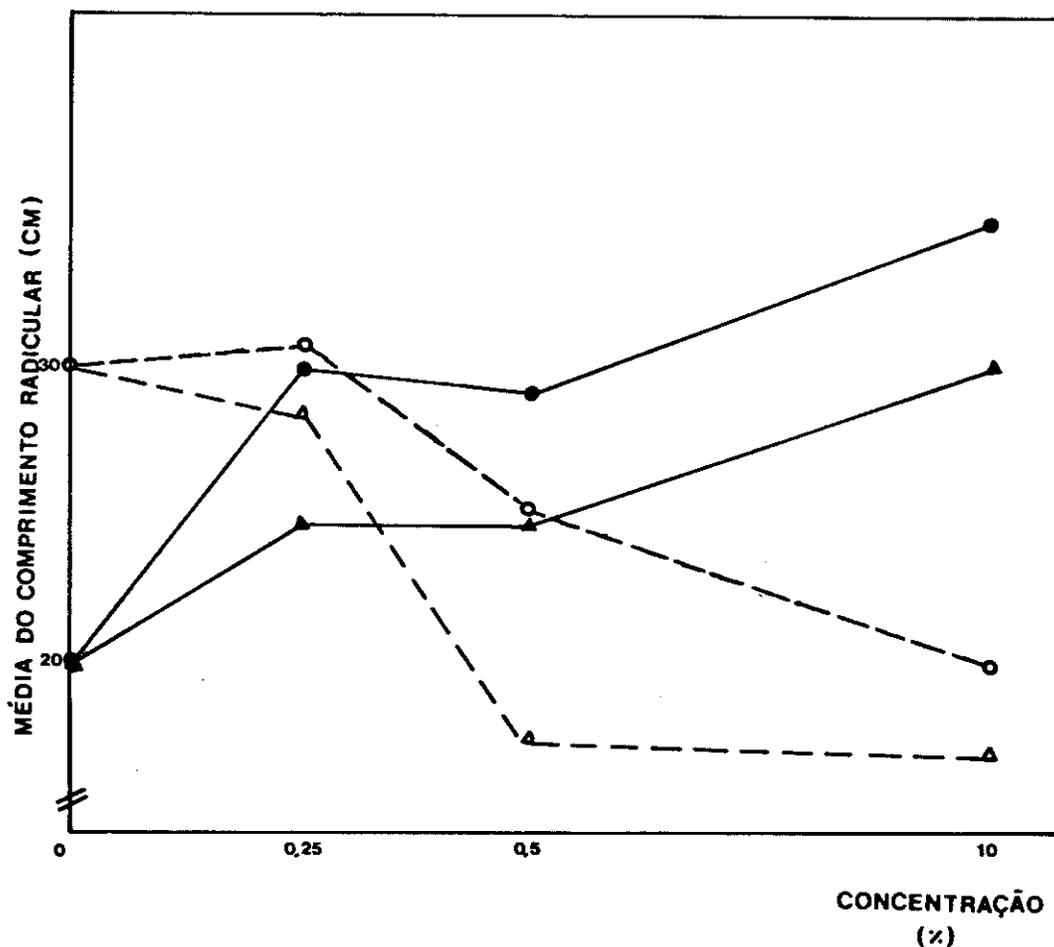


Figura 19- Efeito da inoculação com diferentes concentrações de *Azospirillum brasilense* no crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva: ●—● F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] inoculado com a estirpe 703 Ebc; ▲—▲ F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] inoculado com a estirpe 404 Ed; ○—○ F1 [903 (BC2/910) X 922] inoculado com a estirpe 703 Ebc; △—△ F1 [903 (BC2/910) X 922] inoculado com a estirpe 404 Ed.

Tabela 11- Contraste entre as médias conjuntas dos híbridos F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] Dentado e F1 [903 (BC2/910) X 922] Cateto, inoculados com diferentes concentrações de bactérias.

---

Concentração de inoculante (%)	Média* (cm)
0,00	26,63 a
0,25	29,36 b
0,50	25,80 c
1,00	27,07 d

---

\* As médias acompanhadas da mesma letra não diferiram significativamente ao nível de 5 e de 1 %.

A análise de variância conjunta do efeito causado no crescimento de raízes de plântulas de milho inoculadas com diferentes concentrações de culturas líquidas das estirpes 703 Ebc e 404 Ed, não mostrou diferenças significativas entre os materiais vegetais, estirpes de bactéria ou concentrações de inoculante testados. Diferenças significativas foram encontradas para as interações entre: materiais vegetais e bactérias; estirpes de bactérias e concentrações usadas; e, sobretudo, entre materiais vegetais e concentrações de inoculante (Tabela 12). Logo isso explica as diferenças observadas entre as médias de cada concentração de inoculante, quando analisadas em conjunto, visto que, desta forma, não é possível avaliar o efeito das interações.

A análise das médias do comprimento das raízes do F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] Dentado inoculado com as estirpes 703 Ebc e 404 Ed revelou não haver diferenças significativas entre as concentrações 0,25 e 0,5% de inoculante. A concentração de 1%, entretanto, foi significativamente diferente das outras duas (Tabela 13A). Nesta análise, a média da concentração 0,25% foi tomada como padrão de comparação para a aplicação da análise por polinômios ortogonais.

A análise tridimensional da variância para o híbrido Dentado (Tabela 14) mostrou haver diferenças significativas entre as estirpes de bactéria usadas. Embora o efeito fosse o mesmo, o aumento do comprimento observado com a inoculação com a estirpe 703 Ebc foi maior do que o observado com a aplicação da estirpe 404 Ed (Figura 19).

Tabela 12- Análise da variância conjunta para os híbridos F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] e F1 [903 (BC2/910) X 922] de milho inoculados com diferentes concentrações de bactérias.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Híbridos de milho	1	6,71	6,71	0,103
Estirpes de bactéria	1	27,51	27,51	0,497
Concentrações de bactéria	3	27,90	9,30	0,233
Híb.milho X est.bactéria	1	2,61	2,61	6,86*
Híb.milho X conc.bactéria	1	198,58	66,19	174,18*
Est.bactéria X conc.bactéria	3	10,63	3,54	9,32*
Resíduo	3	1,13	0,38	
Total	15	275,07		

\* F significativo ao nível de 5 e de 1 %.

Tabela 13- Contraste entre as médias do comprimento de raiz de híbridos de milho inoculados com diferentes concentrações de bactérias: (A) F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] Denta-do; (B) F1 [903 (BC2/910) X 922] Cateto.

Híbrido	Concentração (%)	Média* (cm)
(A)	0,25	28,43 a
	0,50	27,85 a
	1,00	32,55 b
(B)	0,25	30,30 a (1)
	0,50	23,74 b
	1,00	21,59 c

\* As médias acompanhadas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 e de 1 %.

(1) A significância dos valores de (B) é independente daquela para os valores de (A).

Tabela 14- Análise da variância pelo método dos polinômios ortogonais para o F1 1910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897) inoculado com diferentes concentrações de bactéria.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Estirpes de bactéria	1	461,13	461,13	12,840*
Regressão	1	425,18	425,18	11,840*
Paralelismo	1	0,74	0,74	0,020
Regressão de 2º grau	1	231,60	231,60	6,450*
Paralelismo	1	7,94	7,94	0,221
Concentrações de bactéria	(5)	1126,59	225,32	6,280*
Resíduo	139	4990,48	35,90	
Total	149	6117,07		

\* F significativo ao nível de 5 e de 1%.

Também foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de inoculante. O valor de regressão calculado foi altamente significativo e houve paralelismo entre as retas. O valor da regressão de 2º grau indica, porém, a existência de uma pequena curvatura nas retas. Não foi observado desvio de curvatura entre as curvas (Tabela 13A).

As médias do híbrido F1 [903 (BC2/910) X 922] de milho Cate-to, inoculado com as duas linhagens bacterianas, são mostradas na Tabela 13 B. Foram observadas diferenças altamente significativas entre as médias das diferentes concentrações de inoculantes, tomando-se a concentração de 0,25% como padrão. A concentração 1% mostrou-se inibitória do crescimento longitudinal das raízes.

Os resultados da análise de variância demonstram haver diferenças altamente significativas entre estirpes de bactéria e concentrações (Tabela 15 ; Figura 19). Observou-se também um valor de regressão altamente significativo com retas paralelas com pequena curvatura oposta (Tabela 15).

As Tabelas 16A e 16B mostram os valores ds médias do comprimento de raízes para os dois materiais vegetais, obtidas com as estirpes 703 Ebc e 404 Ed, respectivamente. Para a estirpe 703 Ebc a concentração 1% apresentou a média mais alta e foi significativamente diferente das concentrações 0,25 e 0,5%, as quais não apresentaram diferenças significativas entre si. A concentração 0,25% apresentou a média mais elevada e mostrou diferença bastante significativa em relação

à concentração 0,5% (média mais baixa). A média verificada para a concentração 1% diferiu significativamente das médias para 0,25 e 0,5% sendo intermediária entre as duas.

A análise da variância dos híbridos de milho inoculados com a linhagem 703 Ebc de *Azospicillum* mostra que há diferenças altamente significativas para as interações entre os materiais vegetais e as concentrações de inoculante. O valor de regressão é significativo porém as retas não são paralelas (Tabela 17).

A análise da variância para a estirpe 404 Ed pode ser vista na Tabela 18 e mostra resultados semelhantes àqueles da estirpe 703 Ebc.

Os resultados expostos demonstram haver uma forte interação entre os materiais vegetais e as concentrações dos inoculantes. Foi observada ainda uma diferença marcante entre os efeitos produzidos pelos diferentes inoculantes sobre os materiais vegetais. Como, em ambos os casos, a concentração de 1% de inoculante apresentou um efeito bastante pronunciado, esta concentração foi utilizada para os experimentos subsequentes.

A diferença de comportamento entre os materiais vegetais poderia ser explicada por diferenças decorrentes de sua origem genética, de acordo com os resultados de ELA et al. (1979) que demonstraram que materiais de diferentes origens apresentaram comportamentos diversos quando inoculados com estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Tabela 15- Análise da variância pelo método dos polinômios ortogonais para o F1 [903 (BC2/910) X 922] inoculado com diferentes concentrações de bactéria.

Causas de variação	Gl	SQ	QM	F
Estirpes de bactéria	1	453,79	453,79	18,150*
Regressão	1	1896,60	1896,60	75,860*
Paralelismo	1	3,80	3,80	0,152
Regressão de 2º grau	1	160,31	160,31	6,410*
Paralelismo	1	127,66	127,66	5,110*
Concentrações de bactéria	(5)	2642,16	528,43	21,140*
Resíduo	139	3474,91	25,00	
Total	149	6117,07		

\* F significativo ao nível de 5 e de 1%.

Tabela 16- Contraste entre as médias conjuntas de dois híbridos de milho inoculados com: (A) estirpe 703 Ebc, (B) estirpe 404 Ed de *Azospirillum brasilense*.

Estirpes de bactéria	Concentração de bactéria (%)	Média* (cm)
703 Ebc	0,25	30,81 a
	0,50	20,04 b
	1,00	28,63 b
404 Ed	0,25	27,91 a (1)
	0,50	23,56 b
	1,00	25,51 c

\* As médias acompanhadas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 e de 1%.

(1) A significância dos valores de (B) é independente daquela para os valores de (A).

Tabela 17- Análise da variância dos híbridos de milho inoculados com a estirpe 703 Ebc de *Azospirillum brasilense*.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Híbridos de milho	1	730,41	730,41	24,39*
Regressão	1	119,24	119,24	3,98*
Paralelismo	1	941,26	941,26	31,43*
Regressão de 2º grau	1	94,08	94,08	3,14
Paralelismo	1	69,50	69,50	2,32
Concentrações de bactéria	(5)	1954,49	390,90	13,05*
Resíduo	139	4162,58	29,95	
Total	149	6117,07		

\* F significativo ao nível de 5 e de 1 %.

Tabela 18- Análise da variância dos híbridos de milho inoculados com a estirpe 404 Ed de *Azoseirillum brasilense*.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Híbridos de milho	1	721,17	721,17	26,62*
Regressão	1	144,24	144,24	5,32*
Paralelismo	1	1121,58	1121,58	41,40*
Regressão de 2º grau	1	330,54	330,54	12,20*
Paralelismo	1	33,40	33,40	1,23
Concentrações de bactéria	(5)	2350,93	470,19	17,37*
Resíduo	139	3766,14	27,09	
Total	149	6117,07		

\* F significativo ao nível de 5% e de 1%.

Quanto aos resultados das interações entre bactéria e material vegetal, as diferenças poderiam estar relacionadas à existência de fatores bacterianos e da planta que atuem seletivamente favorecendo, ou não, a associação. Esses fatores poderiam ser: diferentes níveis endógenos, no vegetal, de substâncias atrativas à bactéria; excreção, pela bactéria de uma ou mais substâncias promotoras de crescimento que agiriam de forma diversa sobre as plantas de acordo com o nível endógeno destas substâncias no vegetal; existência, no vegetal, de precursores de substâncias mais complexas que seriam utilizados pela bactéria e eficiência da bactéria em sintetizar essas substâncias mais complexas; existência de seletividade hospedeira determinada pela ação de um ou mais dos fatores mencionados.

5-6-2- Efeito de diferentes concentrações de triptofano no crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva.

Diferentes concentrações de triptofano, tido como precursor do AIA, foram adicionadas à solução de crescimento das plântulas dos híbridos do milho Cateto e Dentado, inoculados com a estirpe 703 Ebc de *A. brasilense*, produtora de ácido indol-acético, esperando-se estimular a produção bacteriana de auxina e, por conseguinte, afetar o desenvolvimento radicular. O efeito das concentrações de triptofano no comprimento radicular pode ser visto na Figura 20. Os desvios não foram indicados nas figuras pois seria difícil representá-los na escala usada. O coeficiente de variação para o híbrido F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] foi de 3% e para o F1 [903 (BC2/910) X 922] foi de 3,5%

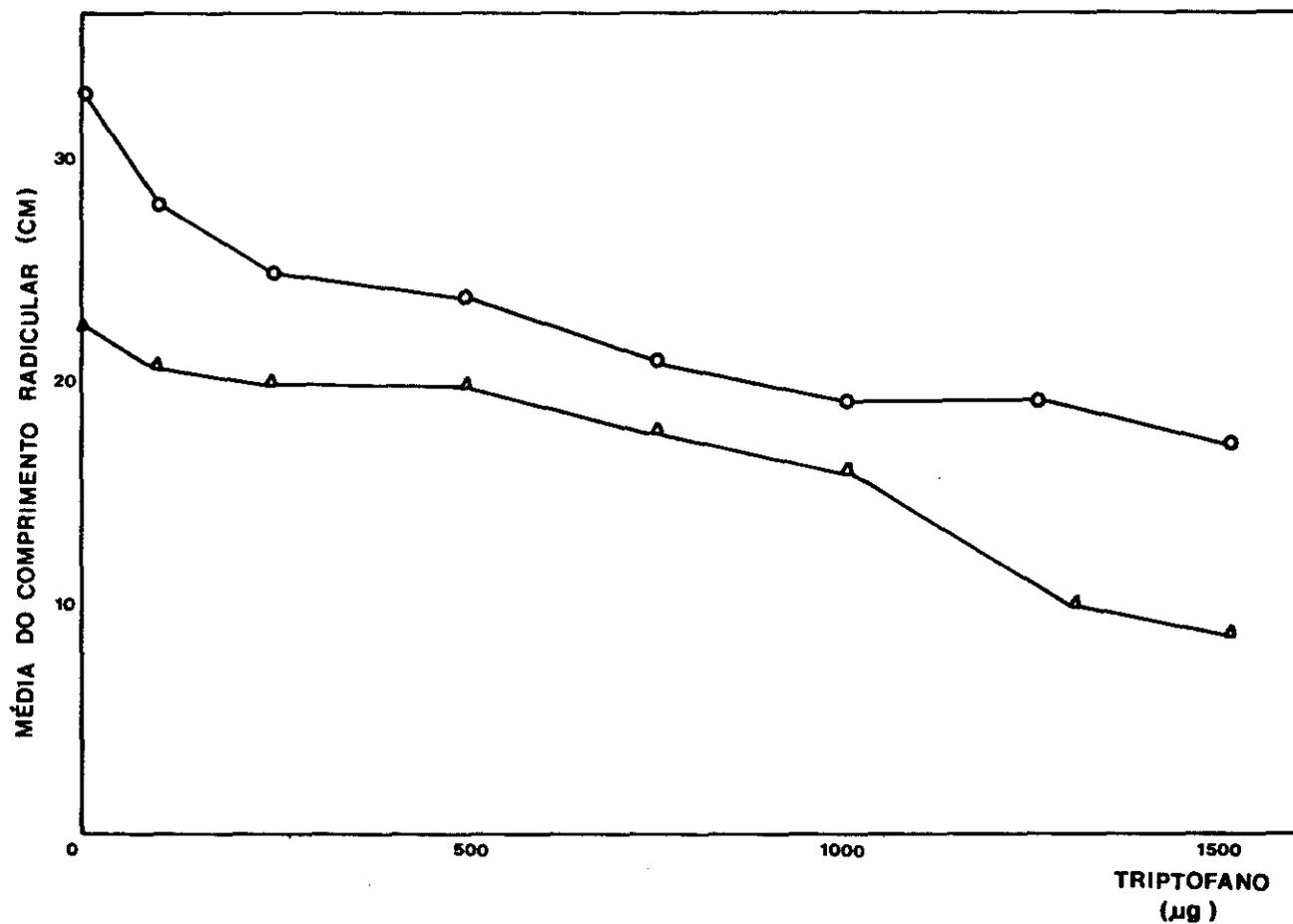


Figura 20- Efeito da adição de diferentes concentrações de triptofano sobre o crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva: (○—○) F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)]; (△—△) F1 [903 (BC2/910) X 922].

O teste de Tuckey para as médias conjuntas do efeito das diferentes concentrações de triptofano para os materiais vegetais, revelou diferenças significativas entre as médias, exceto entre as concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  e entre 1250 e 1500  $\mu\text{M}$  (Tabela 19).

A análise da variância mostrou diferenças significativas entre os materiais vegetais e entre as concentrações do aminoácido (Tabela 20). Foram observadas ainda interações entre os materiais vegetais e as concentrações de triptofano. Na Figura 20 pode-se verificar que determinadas concentrações exerceram um efeito mais pronunciado no milho Cateto do que no Dentado, e vice-versa.

Observando as Figuras 19 e 20, nota-se que o efeito da estirpe 703 Ebc no crescimento das raízes do milho F1 [910 (BC2/1039) X 1005 (BC2/897)] não foi o mesmo quando na presença do triptofano. Esperavase que a adição de triptofano estimulasse a produção de AIA pela bactéria e que isso afetasse o comprimento da raiz. A diminuição do comprimento da raiz do híbrido Dentado poderia, então, ter sido causada pela presença da auxina na solução de crescimento das plântulas. Para verificar o tipo de efeito exercido pela auxina no comprimento das raízes dos híbridos, foi realizado um experimento em que adicionou-se AIA à solução de crescimento das plântulas.

5-6-3- Efeito de diferentes concentrações de ácido indol-acético (AIA) no crescimento de raízes de plântulas de milho em solução nutritiva.

As médias dos comprimentos de raízes para os dois híbridos de milho, crescidos em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de AIA são mostradas na Tabela 21A e B.

Pelos dados do contraste entre as médias, verifica-se que a adição de concentrações crescentes de AIA à solução de crescimento das plântulas, diminuiu o crescimento radicular significativamente, de maneira geral.

Os resultados das análises de variância estão nas Tabelas 22 e 23. São mostradas diferenças significativas entre os materiais vegetais e entre as concentrações da auxina.

Em experimentos com trigo, aplicando AIA ao meio de crescimento das plântulas, JAIN & PATRIQUIN (1983) observaram que a concentração de 0,1 mg de AIA por litro era suficiente para causar redução do comprimento radicular.

Da mesma forma, os resultados obtidos em nossos experimentos indicam que a adição do AIA causou uma inibição no crescimento longitudinal das raízes das plântulas dos dois materiais de milho testados. Assim, a adição da auxina à solução nutritiva ocasionou o mesmo efeito observado quando triptofano foi adicionado, isto é, redução do comprimento das raízes em relação ao tratamento controle. Esse efeito, entretanto, não foi o mesmo detectado quando foi feita a inoculação com as bactérias (Figura 19) que provocou redução do comprimento radicular

para o F1 Cateto e aumento para o F1 Dentado. Logo, mesmo que a redução do comprimento das raízes, quando da adição do triptofano, tenha sido causada por aumento da produção de AIA decorrente da presença de uma maior concentração do seu precursor (triptofano) na solução nutritiva, isso não explicaria os comportamentos descritos na Figura 19.

#### 5-6-4- Efeito da adição de AIA, triptofano, tirosina e fenilalanina no crescimento das raízes de plântulas de milho em solução nutritiva.

Nesse experimento foram observados efeitos altamente inibitórios quando AIA, triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) foram acrescentados à solução de crescimento das plântulas. O efeito inibidor também foi causado pelo AIA sem a presença dos aminoácidos, porém em intensidade menor.

As médias conjuntas do comprimento das raízes do dois híbridos de milho foram: 29,86 cm, para o tratamento controle; 22,27 cm para o tratamento em que adicionou-se apenas o AIA; e 9,50 cm para o tratamento em que foram adicionados AIA, Trp, Tyr e Phe. Essas médias diferiram significativamente entre si ao nível de 5 e de 1%.

A Tabela 24 mostra os resultados da análise de variância.

Caso o efeito inibidor do AIA fosse relacionado à inibição da síntese dos aminoácidos aromáticos, a adição dos mesmos à solução

nutritiva deveria eliminar ou, pelo menos, suavizar o efeito de inibição. Não obstante, observou-se justamente o oposto, ou seja, maior efeito inibidor na presença dos aminoácidos.

Tabela 19- Contraste entre as médias conjuntas do comprimento radicular de plântulas de híbridos de milho crescidas com diferentes concentrações de triptofano e inoculadas com a estirpe 703 Ebc de *Azospirillum brasilense*.

Concentração de triptofano ( $\mu$ M)	Média* (cm)
0	29,72 a
100	25,03 b
250	22,79 c
500	22,17 c
750	19,48 d
1000	17,19 e
1250	14,36 f
1500	13,46 f

\* As médias acompanhadas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% e de 1%.

Tabela 20- Análise da variância conjunta do efeito de diferentes concentrações de triptofano sobre o crescimento radicular de plântulas de híbridos de milho, crescidas em solução nutritiva e inoculadas com a estirpe 703 Ebc de *Azospirillum*.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Híbridos de milho	1	1020,39	1020,39	88,04*
Tratamento	7	3408,19	486,88	42,01*
Híbridos X tratamento	7	153,09	21,87	1,89
Conj.(híbridos X trat.)	15	4581,66	305,44	26,35*
Resíduo	112	1298,61	11,59	
Total	127	5880,27		

\* F significativo ao nível de 5% e de 1%.

Tabela 21- Contraste entre as médias conjuntas do comprimento radicular de plântulas de híbridos de milho crescidas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de ácido indolacético (AIA): (A) concentrações de 0-0,100 mg/l; (B) concentrações de 0-5 mg/l.

Concentração de AIA		Média*
(mg/l)		(cm)
(A)	0,000	34,52 a
	0,025	31,93 bc
	0,050	33,64 ab
	0,100	31,45 c
(B)	0,000	28,65 a (1)
	1,000	23,69 b
	3,000	22,62 bc
	5,000	21,43 cd

\* As médias acompanhadas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%.

(1) A significância dos valores de (B) é independente daquela para os valores de (A).

Tabela 22- Análise da variância conjunta do efeito da adição das concentrações de 0,025, 0,050 e 0,100 mg de ácido indol-acético (AIA) à solução nutritiva, sobre o crescimento das raízes de plântulas de híbridos de milho.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Híbridos de milho	1	4128,42	4128,42	381,91*
Concentrações de AIA	3	1807,66	602,55	55,74*
Híbridos X conc. de AIA	3	60,70	20,23	1,87
Conj.(híbridos X conc.AIA) (7)		5996,78	856,68	79,25*
Resíduo	232	2506,92	10,81	
Total	239	8503,70		

\* F significativo ao nível de 5% e de 1%.

Tabela 23- Análise da variância conjunta do efeito da adição das concentrações de 1, 3 e 5 mg de ácido indol-acético (AIA), à solução nutritiva, sobre o crescimento de raízes de plântulas de híbridos de milho.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Híbridos de milho	1	1395,87	1395,87	60,12*
Concentrações de AIA	3	371,28	123,76	5,33*
Híbridos X conc. de AIA	3	137,93	45,98	1,98
Conj. (híbridos X conc. AIA) (7)		1905,08	272,15	11,73*
Resíduo	232	5383,86	23,21	
Total	239	7288,94		

\* F significativo ao nível de 5% e de 1%.

Tabela 24- Análise da variância conjunta do efeito da adição de ácido indol-acético, triptofano, fenilalanina e tirosina, à solução nutritiva, sobre o crescimento das raízes de plântulas de híbridos de milho- Teste de Cochran-Cox.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Híbridos de milho	1	1539,42	1539,42	5,11*
Tratamento	2	12696,76	6348,38	21,01*
Híbridos X tratamento	2	605,00	302,50	1,03
Conj.(híbridos X trat.)	(5)	14841,18	2968,24	9,84*
Resíduo	174	1339,20	7,70	
Total	179	16180,38		

\* F significativo ao nível de 5% e de 1%.

## 6- CONCLUSÕES

- Os resultados de isolamento e caracterização de *Azospirillum* spp. demonstram a existência de uma grande variabilidade genotípica para as espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* isoladas das raízes de teosinte e milho. Esta variabilidade observada ocorreu de maneira aleatória independentemente do genótipo da planta da qual as bactérias foram isoladas.
- Não foi possível estabelecer qualquer correlação entre a resistência a antibióticos e o nível da produção de AIA observada para as diferentes estirpes de bactéria;
- O método colorimétrico que utiliza o reagente de Salkowski para a quantificação do ácido indol-acético (AIA) mostrou-se mais adequado do que os métodos que utilizam o reagente de Ehrlich e Kovács. A quantificação do AIA presente em sobrenadantes de culturas de *A. brasilense*, por HPLC mostra que a metodologia que emprega a reação colorimétrica com o reagente de Salkowski não é específica para esta análise, uma vez que pode superestimar ou subestimar o conteúdo real do AIA presente na amostra.
- Os principais componentes indólicos encontrados em sobrenadantes de culturas de *Azospirillum brasilense*, crescidas em presença de triptofano (Trp), e analisados por HPLC foram o indol-etanol (IET), indol-metanol (IM) e ácido indol-láctico (ILA) e ácido in-

dol-acético (AIA). Esses resultados foram confirmados pela espectrometria de massa (MS).

- Os resultados da análise do metabolismo do AIA da estirpe 703 Ebc de *A. brasilense* mostrou como principal metabólito o indol-metanol (IM) enquanto que os resultados da análise do metabolismo do AIA de raízes de milho, inoculadas com *Azospicillum*, demonstraram que o principal metabólito polar presente teve as mesmas propriedades e tempo de retenção que o ácido oxindol-acético (OxAIA). O mesmo perfil de metabólitos foi observado para raízes inoculadas e não inoculadas com a bactéria. Isto demonstra que o milho está fazendo a contribuição principal para o catabolismo do AIA nas raízes infectadas; não há, porém, indicação se a fonte do AIA presente nas raízes é bacteriana ou vegetal.
- O método que avalia o efeito de extratos de raízes de milho no crescimento de *Azospicillum* mostrou-se adequado para a discriminação entre diferentes genótipos vegetais.
- O efeito dos extratos vegetais no crescimento das bactérias parece estar relacionado a diferentes níveis de substância(s) estimuladora(s) do crescimento de *Azospicillum*. As diferenças detectadas entre os extratos vegetais poderia ser decorrente de heterose, uma vez que extratos de milho híbrido apresentaram-se superiores aos extratos de linhagem. A origem dos materiais também poderia explicar essa diferença: o híbrido utilizado (F1 1227), desenvolvido em clima tropical onde há grande atividade bacteria-

na no solo durante a maior parte do ano, teria mecanismos de associação que facilitariam um maior interação com as bactérias em questão; o mesmo não seria observado de maneira tão pronunciada na Linhagem Americana desenvolvida em região de clima temperado.

- Híbridos simples de milho, geneticamente diferentes entre si, quando inoculados com diferentes concentrações das estirpes 703 Ebc e 404 Ed, de *Azospicillum brasilense*, apresentaram diferenças significativas nos crescimentos radiculares em relação ao controle. Esse efeito foi dependente do genótipo da planta, e independente do genótipo da bactéria. A variação na produção de AIA pelas diferentes estirpes de *Azospicillum* não está correlacionada com o efeito das bactérias no crescimento radicular das plântulas de milho.
  
- Híbridos simples de milho, geneticamente diferentes entre si, quando crescidos em presença de diferentes concentrações de Trp, AIA e AIA+Trp+Tyr+Phe, apresentaram inibição de seu crescimento radicular em relação ao controle. Não foi possível estabelecer que tipo de efeito fisiológico dessas substâncias está envolvido na inibição do crescimento radicular das plântulas de milho.
  
- O efeito causado pela inoculação de diferentes concentrações das estirpes 703 Ebc e 404 Ed de *Azospicillum*, sobre o crescimento radicular dos diferentes híbridos de milho, não parece estar relacionado à produção de AIA pelas bactérias, uma vez que o efeito da inoculação não foi o mesmo observado quando da adição de dife-

rentes concentrações de AIA.

- A metodologia utilizada, ou seja, crescimento das plântulas de milho em solução nutritiva e avaliação do crescimento radicular, mostrou-se satisfatória para o estudo dos efeitos causados pela inoculação com bactérias, bem como para avaliação de outros tratamentos.

## 7- RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio em gramíneas tem merecido atenção especial nos últimos anos e muitos estudos têm sido desenvolvidos visando uma melhor compreensão dos fatores que influenciam a relação planta-bactéria.

No presente trabalho foram isoladas estirpes de *Azospicillum brasilense* e de *Azospicillum lipoferum* de raízes de teosinte e de milho. Foram identificadas 23 estirpes das duas espécies bacterianas. Essas estirpes foram caracterizadas quanto a sua resistência a antibióticos e produção de ácido indol-acético (AIA). Foi observada uma grande variabilidade, para ambas as características, entre as diferentes estirpes analisadas.

Os principais componentes indólicos encontrados em sobrenadantes de culturas de *Azospicillum brasilense*, crescidas em presença de 0,1 mg de triptofano por ml, quando avaliados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e espectrometria de massa (MS) foram: indol-etanol (IET), indol-metanol (IM) e ácido indol-láctico (ILA). A análise dos indóis presentes em raízes de plântulas de milho, inoculadas e não inoculadas com *Azospicillum*, revelou como seus principais componentes indólicos o ácido indol-acético (AIA) e o ácido oxindol-acético (Ox-AIA).

Quando extratos de raízes de plântulas de milho, geneticamente di-

ferentes, foram adicionados ao meio de crescimento de *Azospicillum*, diferenças significativas foram observadas entre as curvas de crescimento obtidas com extratos do híbrido simples F1 1227, da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, e extratos de uma linhagem de Milho Americano.

A inoculação de híbridos simples de milho, de diferentes origens genéticas, com diferentes concentrações e estirpes de *A. brasilense*, apresentou resultados de crescimento radicular significativamente contrastantes. As diferenças observadas parecem ser dependentes, preponderantemente, do material vegetal usado, não estando correlacionadas com a produção de AIA pelas bactérias.

Quando os mesmos materiais vegetais foram crescidos na presença de triptofano e inoculados com *Azospicillum*, houve uma forte inibição do crescimento radicular de todas as plântulas. Resultados semelhantes foram observados quando AIA e triptofano+fenilalanina+tirosina+AIA estavam presentes no meio de crescimento das plântulas.

## 8- SUMMARY

In recent years much attention has been given to the biological nitrogen fixation in grasses and cereal crops. Many studies have been carried out aiming at a better understanding of the plant-bacteria relationship.

The present paper deals with the isolation of *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum* strains from the roots of teosinte and maize. Twenty-three strains were obtained. These strains were screened for antibiotics resistance and indol-acetic acid (IAA) production. A great variability for both characteristics was observed.

Indol-ethanol (IEt), indol-methanol (IM) and indol-lactic acid (I-LA) were the main indolic components detected in *Azospirillum brasiliense* supernatants, when cells were grown with a 0,1 mg/ml tryptophan supply, by high pressure liquid chromatography and mass spectrometry analysis. Maize roots both inoculated and non-inoculated with *Azospirillum* presented indol-acetic acid (IAA) and oxindol-acetic acid (Ox-IAA) as their main indolic components.

Maize seedling root extracts with different genetic backgrounds added to *Azospirillum* growth media affected the bacterial growth rate. The maize hybrid F1 1227 extracts differed significantly from the extracts of an American Maize Inbred Line.

The results of the seedling root growth rates of maize hybrids with different genetic backgrounds inoculated with distinct strains of *A. brasilense* contrasted significantly. The differences observed are indicative that a main role is performed by the plant material used without correlation to the bacterial IAA production.

The addition of tryptophan to the growth media of plants in combination with *Azospirillum* inoculation caused a severe inhibition of radical growth. Similar results were observed in the presence of IAA and also tryptophan+phenylalanine+tyrosine+IAA.

## 9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, V.L.D. 1980. Especificidade na infecção de raízes de milho, trigo e arroz por *Azospicillum* spp. Tese de Mestrado, UERRJ, 166p.
- BALDANI, V.L.D. e DOBEREINER, J. 1979. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospicillum* spp. *Soil. Biol. Biochem.* 12: 433-439.
- BALDANI, J.I., BLAÑA, A.R.G. e DOBEREINER, J. 1979. Efeito do genótipo do milho na atividade da nitrogenase e da nitrato redutase. *Pesq. Agropec. Bras.* 14: 165-173
- BALDANI, J.I., PEREIRA, P.A.A., ROCHA, R.E.M. e DOBEREINER, J. 1981. Especificidade na infecção de raízes por *Azospicillum* spp. em plantas com via fotossintética C3 e C4. *Pesq. Agropec. Bras.* 16: 325-330.
- BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. e DOBEREINER, J. 1983. Effects of *Azospicillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 924-928.
- BALDANI, V.L.D., ALVAREZ, M.A.B., BALDANI, J.I. e DOBEREINER, J. 1986. Establishment of inoculated *Azospicillum* spp in the rhiz-

- zosphere and in roots of field-grown wheat and sorghum. *Plant Soil* 20: 35-46.
- BARAK, R., NUR, I. e OKON, Y. 1983. Detection of chemotaxis in *Azospicillum brasilense*. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 399-403.
- BEIJERINCK, M.W. 1925. Uber ein Spicillum, welches freien sticksstoff binden kann ? *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. ABI.* 2: 353-359.
- BERKUM, P. van, e BOHLOOL, B.B. 1980. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.* 44: 491-517.
- BODDEY, R. M., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. e DOBEREINER, J. 1986. Effect of inoculation of *Azospicillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant Soil* 25: 109-121.
- BOUTON, J.H., SMITH, R.L., SCHANK, S.C., BURTON, G.W., TYLER, M.E., LITTELL, R.C., GALLAHER, R.N. e QUESENBERY, K.H. 1979. Response of pearl-millet inbred lines and hybrids to inoculation with *Azospicillum brasilense*. *Crop Sci.* 19: 12-16.
- BROWN, M. 1972. Plant growth substances produced by micro-organisms of soil and rhizosphere. *J. Appl. Bacteriol.* 35: 443-451.
- BULOW, J.F.W. von, e DOBEREINER, J. 1975. Potential for nitrogen

- fixation in maize genotypes in Brazil. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 2389-2393.
- CONN, H.J., JENNISON, M. e WEEKS, O.B. 1957. Routine Tests for The Identification of Bacteria. In: Manual of Microbiological Methods. McGraw Hill Book Company Inc., 315 p.
- DE FRANCESCO, R., ZANETTI, G., BARBIERI, P. e GALLI, E. 1985. Auxin Production by *Azospicillum brasilense* under different cultural conditions. In: *Azospicillum III: Genetics, Physiology, Ecology* (W. Klingmuller, ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 274 p.
- DE KONINCK, K., HOREMANS, S. RANDOMBAGE, S. e VLASSAK, K. 1987. Occurrence and Survival of *Azospicillum* sp in temperate regions. In: Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes, pp.44.
- DOBEREINER, J. 1966. *Azotobacter paspali* n. sp. uma bactéria fixadora de nitrogênio na rhizosfera de *Paspalum*. Pesq. Agropec. Bras. 1: 357-365.
- DOBEREINER, J. 1970. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionkc. Hyg. Abt. 2 124: 224-230.
- DOBEREINER, J. 1977. Biological nitrogen fixation in tropical grass-

- ses - possibilities for partial replacement of mineral N fertilizers. *AMBIO* 6: 171-177.
- DOBEREINER, J. e BALDANI, V.L.D. 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25: 1264-1269.
- DOBEREINER, J. e DAY, J.M. 1976. Associative symbioses in tropical grasses - characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: *Proc. of the 1st. International Symposium on Nitrogen Fixation* Washington State University Press, Pullman, pp.518-538.
- DOBEREINER, J., NERY, M. e MARRIEL, I.E. 1976. Ecological distribution of *Spizillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.
- ELA, S.W., ANDERSON, M.A. e BRILL, J.W. 1982. Screening and selection of maize to enhance associative bacterial nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 70: 1561-1567.
- ELMERICH, C. 1983. *Azospirillum* Genetics. In: *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction* (A. Puhler, ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.367-372.
- ERNSTSEN, A., SANDBERG, G., CROZIER, A. e WHEELER, C.T. 1987. Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium ephaseoli*. *Planta* 171:

422-428.

FINSTEIN, M. 1972. Pollution Microbiology. In: A Laboratory Manual. Marcel Dekker Inc. New York, pp.165-168.

HARTMANN, A., SINGH, M. e KLINGMULLER, W. 1983. Isolation and characterization of *Azospicillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 22: 916-922.

HEGAZI, A.N., MONIB, M., AMER, A.H. e SHOKR, E.S. 1983. Response of maize plants to inoculation with azospirilla and (or) straw amendment in Egypt. 1983. *Can. J. Microbiol.* 22: 888-894.

HEINRICH, D. e HESS, D. 1985. Chemotatic attraction of *Azospicillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. *Can. J. Microbiol.* 31: 26-31.

HOREMANS, S. e VLASSAK, K. 1985. Production of indol-3-acetic acid by *Azospicillum brasilense*. In: *Azospicillum III: Genetics, Physiology, Ecology* (W. Klingmuller, ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 274 p.

HOREMANS, S., DE KONINCK, K., NEURAY, J., HERMANS, R. e VLASSAK, K. 1986. Production of plant growth substances by *Azospicillum* and other rhizosphere bacteria. *Symbiosis* 2: 341-346.

ISHAC, Y.Z., EL-HADDAD, M.E., DAFT, M.J., RAMADAN, E.M. e EL-DEMER-

- DASH, M.E. 1986. Effect of sand inoculant, mycorrhizal infection and organic amendment on wheat growth. *Plant Soil* 90: 373-382.
- JAIN, D.K. e PATRIQUIN, D.G. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospicillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31: 206-210.
- KAPULNIK, Y., SARIG, S., NUR, I. e OKON, Y. 1983. Effect of *Azospicillum* inoculation on yield of field-grown wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 895-899.
- KOLB, W. e MARTIN, P. 1985. Response of plant roots to inoculation with *Azospicillum brasilense* and to application of indole acetic acid. In: *Azospicillum* III: Genetics, Physiology, Ecology (W. Klingmuller, ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 274 p.
- LAKSHMI-KUMARI, M., KAVIMANDAN, S.K. e SUBBA RAO, N.S. 1976. Occurrence of nitrogen fixing *Spicillum* in roots of rice, sorghum and other plants. *Ind. J. Exp. Biol.* 14: 638-639.
- LEE, M., BRECKENRIDGE, C. e KNOWLES, R. 1970. Effect of some culture conditions on the production of indole-3-acetic acid and a gibberellin-like substance by *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.* 16: 1325-1330.
- LEMONS, M.V.F., SANTOS, D.S., TRABULSI, L.R. e AZEVEDO, J.L. 1979. Possible role of plasmid deoxyribonucleic acid in nitrogen fixa-

- tion by *Azospirillum brasilense*. In: Proc. Int. Workshop on Associative N<sub>2</sub> Fixation (P.B. Vose and A.P. Ruschel, eds.) CRC Press, Palm Beach, Florida, USA, pp.63-68.
- MAGALHÃES, F.M.M. 1983. Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio. Tese de Mestrado, INPA/Universidade do Amazonas, Manaus, 89 p.
- MAGALHÃES, F.M.M. e DOBEREINER, J. 1984. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. Rev. Microbiol. 15: 246-252.
- MAGALHÃES, F.M.M., PATRIQUIN, D.G. e DOBEREINER, J. 1979. Infection of field-grown maize with *Azospirillum* spp. Rev. Bras. Biol. 32 (3): 587-596.
- MAGALHÃES, F.M.M., BALDANI, J.I., SOUTO, S.M., KUYKENDALL, J.R. e DOBEREINER, J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Bras. Ciên. 55: 417-429.
- MANDELL, G.L. e SANDE, M.E. 1983. Quimioterapia das Doenças Microbianas. Em: As Bases Farmacológicas da Terapêutica (A.G. Gilman, L.S. Goodman, A. Gilman, eds.) Guanabara Koogan, 1599 p.
- MERRICK, M. e DIXON, R. 1984. Why don't plants fix nitrogen? Trends Biotechnol. 2: 162-165.

- MIRANDA FILHO, J.B. e VIEGAS, G.P. 1987. Milho Híbrido. Em: Melhoramento e Produção do Milho (Fundação CARGILL) I, 409 p.
- OKON, Y. 1985. *Azospicillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.* 2: 223-228.
- OKON, Y. e KAPULNIK, Y. 1986. Development and function of *Azospicillum* inoculated roots. *Plant Soil* 90: 3-16.
- PATRIQUIN, D.G. e DOBEREINER, J. 1978. Light microscopy of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 24: 734-742.
- RAO, A.V. e VENKATESWARLU, B. 1985. Most probable numbers of *Azospicillum* associated with the roots of inoculated pearl millet. *Plant Soil* 88: 153-158.
- REYNDERS, L. e VLASSAK, K. 1976. Nitrogen fixing *Seirillum* species in Belgium Soils. *Agricultura* 24: 329-326.
- REYNDERS, L. e VLASSAK, K. 1979. Conversion of tryptophan to indole acetic acid by *Azospicillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 11: 547-548.
- RITTENBERG, D. e FOSTER, G.L. 1940. A new procedure for quantitative analyses by isotopic dilution, with application to determination of amino acids and fatty acids. *J. Biol. Chem.* 133: 737-744.

- ROBBS, C.F. 1960. Estudos sobre o controle do cancro bacteriano do tomateiro (*Corynebacterium michiganense*) com especial referência a estreptomicina. Em: *Bacterioses Eitoeatogênicas no Brasil*. (C. F. Robbs, ed.), Ser. Divulg. Pesq. Nº 2, UFRRJ, pp.47-63.
- ROMANOW, I. 1965. Recherches sur la synthese de l'acide indole-3-acetique par les Azotobacter. *Ann. Inst. Pasteur Suppl.* 3102: 280-292.
- RUSCHEL, A.P., ARRUDA, P. e SILVA, W.J. da. 1979. N<sub>2</sub> fixing populations in seeds and plant parts of teoside and mazoide plants from *Zea mays* X *Zea mexicana* (teosinte) crosses. In: *Proc. Int. Workshop on Associative N<sub>2</sub> Fixation* (P.B. Vose and A.P. Ruschel, eds.) CRC Press, Palm Beach, Florida, USA, pp.179-184.
- SANDE, M.A. e MANDELL, G.L. 1983. Quimioterapia das Doenças Microbianas. Em: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* (A.G. Gilman, L.S. Goodman, A. Gilman, eds.) Guanabara Koogan, 1599 p.
- SANDBERG, G., CROZIER, A. e ERNSTSEN, A. 1987. *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis 2*. Academic Press Inc., 260 p.
- SARIG, S., KAPULNIK, Y. e OKON, Y. 1986. Effect of *Azospicillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant and Soil* 90: 335-342.

- SLOGER, C. e OWENS, L.D. 1977. N<sub>2</sub> fixation by a temperate corn-*Spi-*  
*cillum* association. In: 2nd Int. Symp. N<sub>2</sub> Fixation, Salamanca,  
Spain.
- SMALY, V.T. e BERSHOVA, O.I. 1957. Heteroauxin formation in *Azoto-*  
*bacter* cultures. *Microbiology* 26: 520-526.
- SOUTO, S.M. 1982. Variação Estacional da Fixação de N<sub>2</sub> e Denitrifi-  
cação em Gramíneas Forrageiras Tropicais. Tese de Doutorado,  
UERJ, 268 p.
- SUBBA RAO, N.S., TILAK, K.V.B.R. e SINGH, C.S. 1985. Effect of com-  
bined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbus-  
cular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant*  
*Soil* 84: 283-286.
- TANG, Y.W. e BONNER, J. 1947. The Enzymatic Inactivation of Indo-  
leacetic Acid. I- Some characteristics of the enzyme contained in  
pea seedlings. *Arch. Biochem.* 13: 11-25.
- TARRAND, J.J., KRIEG, N.R. e DOBEREINER, J. 1978. A taxonomic study  
of *Spicillum lieoferum* group, with description of a new genus,  
*Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lieoferum*  
(Beijerinck). comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.  
*Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- TIEN, T.M., GASKINS, M.H. e HUBBELL, D.H. Plant growth substances

- produced by *Azospicillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 1016-1024.
- UMALI-GARCIA, M., HUBBELL, D.H., GASKINS, M.K., e DAZZO, F.B. 1980. Association of *Azospicillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 219-226.
- WANG, T.L., WOOD, E.A. e BREWIN, N.J. 1982. Growth regulators, Rhizobium and nodulation in peas. *Planta* 155: 345-349.
- YATES, M.G. 1980. Biochemistry of Nitrogen Fixation. IN: *The Biochemistry of Plants 5*. Academic Press Inc., pp.1-64.
- ZABOROWSKY, S., ARRUDA, P. e SILVA, W.J. da. 1980. Presença de bactérias fixadoras de nitrogênio em *Zea diploperennis*. Em: *Resumos da 1a. Reunião Científica do Depto. de Genética e Evolução, UNICAMP.*