

# PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 4, fev./98, p.1-10

## Resultados de Pesquisa sobre Inoculação de Trigo, de Cevada e de Milho com Bactérias do Gênero *Azospirillum*



Agostinho Dirceu Didonet<sup>1</sup>

No Brasil, os estudos com bactérias do gênero *Azospirillum* tomaram grande impulso a partir dos trabalhos da pesquisadora Joanna Döbereiner e colaboradores, na década de 1970. Desde então, a associação dessas bactérias com várias espécies de plantas, principalmente gramíneas e cereais, tem sido bastante estudada. Basicamente, esses estudos buscam a possibilidade de utilização agrônômica dessas bactérias, como um biofertilizante promotor de crescimento radicular, no sentido de melhorar a eficiência de utilização de nitrogênio, de água e de outros nutrientes, pelas plantas dessas espécies.

À medida que mais conhecimento científico foi adquirido, nos últimos anos, especialmente no que se refere ao motivo pelo qual essas bactérias provocam efeitos benéficos nas plantas, sua utilização prática, como inoculante para gramíneas em geral, tem despertado maior interesse. Tais efeitos, descritos até o momento, incluem fixação biológica de nitrogênio atmosférico, promoção do crescimento radicular, aumento na absorção de nitrogênio, de fósforo e de potássio e, também, melhor utilização da água pelas plantas.

Além do uso potencial como inoculante na agricultura, há, também, a possibilidade de uso industrial de produtos originados da atividade metabólica dessas bactérias. Entre esses produtos, incluem-se espessantes derivados de polihidroxibutiratos, que são usados na indústria de cosméticos e na de detergentes e como substitutos da goma arábica. Podem, também, ser usadas na purificação da água dos resíduos urbanos, através da retirada dos nitratos, na produção de várias vitaminas de uso farmacológico, na degradação de celulose em combinação com outras bactérias celulolíticas e na degradação de resíduos tóxicos, originados da fabricação de pesticidas, de explosivos, de solventes industriais e de vários outros poluentes ambientes, originários de processos químico-industriais.

<sup>1</sup> Eng.-Agr., Dr. Embrapa Trigo, C.P. 451, CEP 99001-970 Passo Fundo, RS. Bolsista do CNPq.



Atualmente, as principais linhas de pesquisa que envolvem essas bactérias buscam quantificar e identificar os possíveis efeitos benéficos que elas podem proporcionar às plantas. Tais linhas de pesquisa objetivam estudar o efeito da inoculação de plantas em geral com microorganismos; o papel que a bactéria e a planta desempenham quando em associação; a especificidade e a afinidade entre seus genótipos; e as conseqüências da associação dessas bactérias com as plantas, considerando o ambiente.

Analisando as publicações disponíveis na literatura mundial, nas quais são relatados os resultados de trabalhos de pesquisa sobre o efeito da inoculação de plantas com *Azospirillum*, algumas conclusões podem ser relacionadas. Em função da inconsistência e, em alguns casos, da imprevisibilidade dos resultados com inoculação, em condições de campo, o uso em larga escala de inoculante à base de *Azospirillum*, salvo em alguns países, não tem evoluído como seria de se esperar. Certamente uma das causas pelas quais ainda não se tenha obtido resultados mais animadores é que não foi desenvolvido, ainda, um carreador adequado, que funcione como um bom veículo para as bactérias serem efetivamente colocadas em contato com as raízes das plantas que se quer inocular.

Desde que foi prevista a possibilidade de uso dessas bactérias como inoculante, há mais de 20 anos, ainda é usada, como veículo para a inoculação, a mesma turfa desenvolvida como carreador para *Rhizobium*, com algumas adaptações. É óbvio, então, que, sem uma maneira prática e funcional de fabricação, de conservação e de comercialização, nenhum microorganismo benéfico terá chance de ser usado, em larga escala, em agricultura como uma prática corriqueira.

A possibilidade de misturar, em um mesmo inoculante, *Azospirillum* e outros microorganismos benéficos para as plantas pode, em alguns casos, apresentar respostas superiores àquelas observadas em relação aos microorganismos isolados. Por exemplo, existem resultados bastante confiáveis de que a presença de *Azospirillum* no inoculante para soja aumenta significativamente a nodulação e a conseqüente eficiência do *Bradyrhizobium* em fixar nitrogênio, em condições de campo.

Nos últimos 20 anos, 60 % a 70 % dos experimentos conduzidos com inoculação de *Azospirillum*, em várias culturas e em diferentes condições climáticas, mostraram aumentos de produtividade de até 30 %. Nas condições de Passo Fundo, RS, onde se localiza o Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, têm sido encontrados aumentos de produção de trigo nem sempre dessa mesma magnitude. Por exemplo, em tratamentos onde não se usou adubação nitrogenada (Tabela 1) ou quando foram usados 15 kg N/ha, aplicados na semeadura (Tabela 2), tem-se observado, em alguns casos, aumentos de rendimento nessa ordem, abaixo, no entanto, da produtividade normal com adubação nitrogenada de 60 kg N/ha. Com alguma freqüência, embora não significativamente, tem-se observado aumento na produção de biomassa seca, inclusive em tratamentos com adubação nitrogenada normal, com conseqüente maior absorção de nitrogênio, o que nem sempre se reflete em aumento na produção de grãos de trigo (Tabelas 3 e 4).

Alguns ensaios têm mostrado que a inoculação proporciona um aumento percentual no teor de nitrogênio dos grãos (Tabela 1). Isso significa que a quantidade



de proteínas desses grãos foi maior do que a daqueles de plantas que não foram inoculadas. Aparentemente, essas respostas são devidas a um aumento no volume e na massa radicular (Tabela 5), o que resulta em maior área de solo, que pode ser explorada pela planta.

Resultados ainda bastante preliminares indicaram, no ano agrícola 1996/97, que as mesmas observações obtidas em trigo são igualmente válidas para cevada (Tabela 6) e para milho (Tabela 7). Em cevada, resultados ainda bastante preliminares, observou-se um aumento no número de afilhos férteis por planta, o que não foi correlacionado com o rendimento (Tabela 6). Em milho, resultados de somente um ano indicaram que a inoculação proporcionou um aumento na produção de grãos da ordem de 20 %, em relação ao tratamento sem adubação nitrogenada, em área cultivada com ervilhaca no inverno (Tabela 7). Resultados dessa mesma magnitude também têm sido encontrados, em alguns casos, em milho cultivado em certas áreas na Argentina e também no México.

Tem sido observado, por vários autores, que a estirpe de *Azospirillum* usada como inoculante também é um fator que afeta, de alguma forma, as respostas das plantas inoculadas. Há indicações mostrando que nem todas as cultivares de trigo respondem de maneira semelhante, quando inoculadas com diferentes estirpes. Nos testes efetuados, em casa-de-vegetação, para selecionar novas bactérias isoladas, têm-se observado interações entre as cultivares de trigo e os isolados dessas bactérias (Tabelas 5 e 8). Algumas cultivares de trigo, como, por exemplo, Embrapa 16, têm mostrado respostas diferentes à inoculação, quando comparadas à cultivar BR 35 (Tabela 8). Essas observações, que também são partilhadas pelos pesquisadores que trabalham na equipe da dra. J. Döbereiner (Centro de Pesquisa em Agrobiologia - Embrapa Agrobiologia), indicam que muito provavelmente só serão alcançados resultados melhores do que os obtidos até o momento se for realizada uma seleção adequada das bactérias isoladas na região, levando em conta, também, a cultivar de trigo.

Segundo observações, também preliminares, essas bactérias, aparentemente, apresentam uma biodiversidade bastante grande (Tabela 9). Isso significa que existe um grande número de estirpes de cada espécie que ocorrem naturalmente nos solos do sul do Brasil. Sem dúvida, para se obter efetividade na inoculação, será preciso que a bactéria, a ser introduzida junto com a semente, tenha competitividade em relação às bactérias já existentes no solo e em colonizar rapidamente as raízes, assim que ocorra a emergência. É talvez por essa razão que os resultados observados, quando são realizados experimentos de inoculação, em condições de campo, com essas bactérias, nos quais são observados aumentos de biomassa das plantas (Tabelas 3 e 4), nem sempre são correlacionados com aumento no rendimento.

Normalmente, os resultados positivos da inoculação, verificados em condições de campo, nem sempre podem ser atribuídos à bactéria que foi inoculada, pois mesmo nos tratamentos sem inoculação observa-se um percentual elevado de raízes infectadas com essas bactérias (Tabela 10). Essa infecção pode ser perfeitamente decorrente do aumento no número de bactérias já existentes no solo e não da bactéria inoculada. Nesse sentido, todos os pesquisadores que trabalham nessa área estão



*buscando metodologias adequadas para reisolar e para identificar corretamente as bactérias introduzidas e poder, então, relacionar os resultados positivos com as bactérias que estão associadas às raízes. Algumas técnicas recentes empregadas na biologia molecular, conhecidas como marcadores moleculares, poderão contribuir de maneira decisiva para a identificação e para a caracterização dessas bactérias, de maneira a orientar as futuras pesquisas que envolvem associações entre microorganismos benéficos e plantas cultivadas.*

*Os resultados obtidos até o momento ainda não permitem que essas bactérias possam ser usadas como inoculante para aumentar significativamente o rendimento de grãos de trigo e de outros cereais. Porém, com o avanço nas pesquisas, buscando outras bactérias mais adaptadas às diferentes condições ambientes, nas diversas regiões tritícolas, é possível que, em futuro próximo, isso venha a ocorrer. Deve-se levar em conta também que, mesmo não havendo aumento no rendimento de grãos, se for possível uma diminuição no uso de fertilizantes, principalmente os nitrogenados, sem haver diminuição desse rendimento, estar-se-á contribuindo para uma agricultura realmente sustentável.*

### **Referências Bibliográficas**

- CANDATEN, A.A. *Eficiência do uso de nitrogênio em cevada inoculada com bactérias do gênero Azospirillum*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1997. 44p. Relatório CNPq.
- DIDONET, A.D. *Manejo de nitrogênio em sistemas de cultivo*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1997. 87p. (EMBRAPA. Programa 04 - Grãos. Subprojeto 04.0.94.342.10). Projeto em andamento.
- DIDONET, A.D.; CANDATEN, A.A.; LIMA, O.S. *Eficiência do uso de nitrogênio em trigo e cevada inoculados com bactérias do gênero Azospirillum*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1997. 75p. Relatório CNPq.
- DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. *Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com Azospirillum brasilense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.31, p.645-651, 1996.
- DIDONET, A.D. *Manejo de nitrogênio em sistemas de cultivo*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1995. 27p. (EMBRAPA. Programa 04 - Grãos. Subprojeto 04.0.94.342.10). Projeto em andamento.
- DALL'AGNOL, M.; RODRIGUES, O.; DIDONET A.D. *Avaliação da inoculação do trigo com Azospirillum spp. no CNPT*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1990. 23p. Relatório FAPERGS.
- LIMA, O.S. *Eficiência do uso de nitrogênio em trigo inoculado com bactérias do gênero Azospirillum*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1997. 42p. Relatório CNPq.
- MARTIN, C.C.G. *Caracterização bioquímico/molecular de bactérias do gênero Azospirillum*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1997. 85p. Relatório DTI-RHAE/CNPq.



**Tabela 1.** Produção de grãos e eficiência de utilização do nitrogênio adicionado de plantas de trigo cujas sementes foram inoculadas com inoculante turfoso, em pó e granulado, das estirpes de *Azospirillum brasilense* 245 e JA04

Tratamento	Produção de grãos (kg.ha <sup>-1</sup> )	Produção de grãos acima da testemunha (%)	kg grão acima da testemunha/kg N adicionado (kg/kg)	Aumento do N-total do grão, acima da testemunha (%)
Testemunha, sem inoculante e sem nitrogênio	2.382 d <sup>1</sup>	0,0	0,0	0,0
Inoculante turfa em pó, estirpe 245	2.886 bcd	21,1	-	20,7
Inoculante turfa em pó, estirpe JA04	3.075 bc	29,1	-	36,9
Inoculante turfa granulada, estirpe 245	2.726 cd	14,4	-	14,7
Inoculante turfa granulada, estirpe JA04	2.935 bcd	23,2	-	27,6
Inoculante turfa em pó, estirpe 245, e 15 kg N.ha <sup>-1</sup> na semente	3.155 b	32,4	51,5	33,1
Inoculante turfa em pó, estirpe JA04, e 15 kg N.ha <sup>-1</sup> na semente	3.520 a	47,8	75,9	53,2
15 kg N.ha <sup>-1</sup> na semente e 45 kg N.ha <sup>-1</sup> no afilhamento	4.211 a	76,8	30,5	76,7

<sup>1</sup> Valores seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Fonte: Didonet et al.(1996).

**Tabela 2.** Rendimento de grãos da cultivar de trigo Embrapa 16, submetida a doses de nitrogênio aplicado em diferentes épocas e inoculada com a estirpe 245 de *Azospirillum brasilense* e com o isolado 25 de *Azospirillum lipoferum* - média de quatro repetições

Tratamento <sup>1</sup>	Rendimento de grãos (kg/ha)	Aumento no rendimento devido à inoculação (%)
<b>15 kg N/ha aplicados na semeadura</b>		
Sem Inoculante	3.127	0,0
Inoculante 245	3.802	21,5
Inoculante 25	3.595	14,9
<b>15 kg N/ha aplicados na semeadura e 45 no estádio de duplo anel</b>		
Sem Inoculante	3.652	0,0
Inoculante 245	4.040	10,6
Inoculante 25	3.882	6,3

<sup>1</sup> A inoculação foi realizada com inoculante turfoso em pó, estirpe 245, fornecido pela Embrapa Agrobiologia.

Fonte: Didonet et al. (1997).

**Tabela 3.** Massa seca de folhas e de colmos e total, determinada na maturação fisiológica, da cultivar de trigo Embrapa 16, submetida a duas doses e em duas diferentes épocas de aplicação de nitrogênio e inoculada com a estirpe 245 de *Azospirillum brasilense* e com o isolado 25 de *Azospirillum lipoferum* - média de quatro repetições

Tratamento <sup>1</sup>	Massa seca (g/m <sup>2</sup> )			
	Folhas	Colmos	Espigas	Total
<b>15 kg N/ha aplicados na semeadura</b>				
Sem Inoculante	35	166	217	418
Inoculante 245	40	199	258	497
Inoculante 25	38	199	250	487
<b>15 kg N/ha aplicados na semeadura e 45 no estádio de duplo anel</b>				
Sem Inoculante	39	187	255	481
Inoculante 245	43	223	283	549
Inoculante 25	46	225	278	549

<sup>1</sup> A inoculação foi realizada com inoculante turfoso em pó, estirpe 245, fornecido pela Embrapa Agrobiologia.

Fonte: Didonet et al. (1997)



**Tabela 4.** Massa seca total da cultivar de trigo Embrapa 16, determinada na antese, cujas sementes foram inoculadas e não foram inoculadas com a estirpe de *Azospirillum lipoferum* JA25, sob diferentes doses de nitrogênio aplicado na semeadura, no afilhamento, no emborrachamento e na antese - média de quatro repetições

Tratamento	Massa seca (kg/ha)	
	Inoculado <sup>1</sup>	Sem inoculação
Testemunha	840,5 cA <sup>2</sup>	1.082,2 bA
15 kg N/ha na semeadura + 45 kg N/ha no afilhamento	2.612,8 aB	3.380,6 aA
15 kg N/ha na semeadura + 45 kg N/ha no emborrachamento	1.762,2 bA	1.185,0 bB
30 kg N/ha na semeadura + 30 kg N/ha na antese	1.252,8 bcA	1.178,9 bA
30 kg N/ha na semeadura + 30 kg N/ha no emborrachamento	1.615,6 bA	1.282,2 bA

<sup>1</sup> Inoculado com inoculante turfoso em pó, estirpe de *Azospirillum lipoferum* JA25.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Duncan, a 5 % de probabilidade.

Fonte: Didonet (1995).

**Tabela 5.** Acúmulo de massa seca da parte aérea e da raiz e comprimento radicular de plantas de trigo, crescidas em jarras de Leonard com solução nutritiva em casa-de-vegetação, inoculadas com inoculante turfoso em pó de duas estirpes de *Azospirillum* - valores médios de cinco linhagens e das cultivares Embrapa 16 e BR 35, em três repetições

Tratamento	Acúmulo de massa seca (mg/2 plantas)		Comprimento médio da raiz principal (cm)
	Parte aérea	Raiz	
Sem inoculação	98,6 b <sup>3</sup>	52,3 a	47,8 b
Inoculante JA03 <sup>1</sup>	97,6 b	57,3 a	46,6 b
Inoculante 245 <sup>2</sup>	113,0 a	59,5 a	50,6 a

<sup>1</sup> Estirpe de *Azospirillum lipoferum*, isolada de raízes lavadas de trigo na Embrapa Trigo.

<sup>2</sup> Estirpe padrão de *Azospirillum brasilense*, fornecida pela Embrapa Agrobiologia.

<sup>3</sup> Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 5 % de probabilidade.

Fonte: Dall'Agnol et al. (1990).



**Tabela 6.** Número de afilhos férteis e rendimento de grãos da cultivar de cevada cervejeira BR 2, inoculada com a estirpe de *Azospirillum brasilense* 245 e com o isolado de *Azospirillum lipoferum* 25 - média de quatro repetições

Tratamento	Afilhos férteis por planta	Rendimento de grãos (kg/ha)	Aumento de rendimento devido à inoculação (%)
<b>Sem nitrogênio</b>			
Testemunha	2,05	2.480	0,0
Inoculante estirpe 245 <sup>1</sup>	2,28	2.844	14,7
Inoculante isolado 25 <sup>2</sup>	2,21	2.440	-1,6
<b>45 kg N/ha aplicados no aphilamento</b>			
Testemunha	2,82	3.144	0,0
Inoculante estirpe 245	2,45	2.834	-9,8
Inoculante isolado 25	2,66	3.276	4,2

<sup>1</sup> Estirpe padrão de *Azospirillum brasilense*, fornecida pela Embrapa Agrobiologia.

<sup>2</sup> Isolado na Embrapa Trigo, em raízes de trigo Embrapa 16, provavelmente *Azospirillum lipoferum*.  
Fonte: Candaten (1997); Lima (1997); Martin (1997).

**Tabela 7.** Efeito da inoculação das sementes de um híbrido superprecoce de milho com a estirpe de *Azospirillum brasilense* 245 e com o isolado de *Azospirillum lipoferum* 25 na produção de grãos - média de quatro repetições<sup>1</sup>

Tratamento <sup>2</sup>	Rendimento de grãos (kg.ha <sup>-1</sup> )	Aumento no rendimento de grãos em relação à testemunha (%)
Sem N e sem inoc. (Testemunha)	5.775	0,0
Sem N e Inoc. Estirpe 245	6.966	20,6
Sem N e Inoc. Isolado 25	6.696	15,9

<sup>1</sup> Ensaio conduzido em plantio convencional, em área cultivada com ervilhaca no inverno, com densidade de 62.500 plantas de milho/ha.

<sup>2</sup> A inoculação foi realizada com inoculante turfoso em pó, estirpe 245, fornecido pela Embrapa Agrobiologia.

Fonte: Didonet (1997).

**Tabela 8.** Efeito da inoculação com inoculante turfoso em pó de duas estirpes de *Azospirillum lipoferum*, JA25 e JA03, no acúmulo de massa seca da parte aérea e radicular e no comprimento da raiz principal de plântulas de 20 dias de idade de duas cultivares de trigo, crescidas em jarras de Leonard com solução nutritiva de Hoagland, em casa-de-vegetação - média de três repetições

Cultivar	Sem inoculante	Inoculante JA25	Inoculante JA03
<b>Acúmulo de massa seca da parte aérea (mg/2plantas)</b>			
Embrapa 16	75,0	89,3	88,5
BR 35	88,3	114,5	110,8
<b>Acúmulo de massa seca radicular (mg/2plantas)</b>			
Embrapa 16	49,2	55,5	56,8
BR 35	54,5	61,0	59,5
<b>Comprimento da raiz principal (cm)</b>			
Embrapa 16	49,3	57,0	50,0
BR 35	47,0	57,5	54,0

Fonte: Dall'Agnol et al. (1990).



**Tabela 9.** Proposta de identificação de algumas estirpes de *Azospirillum* spp. isoladas de raízes de trigo, de cevada e de milho, na região de Passo Fundo, RS

	Origem	Isolado <sup>1</sup>	Espécie Provável
Estirpes isoladas de trigo	Embrapa 16	14A	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	14B	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	25	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	78III	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	79I	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	79II	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	82A	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	82B	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	82C	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	92II	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 16	93I	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	BR 35	81III	<i>Herbaspirillum</i> sp.
	Nobre	83III	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Nobre	85III	<i>Azospirillum lipoferum</i>
Estirpes isoladas de cevada	Nobre	86II	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Nobre	87IIB	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Nobre	87-6	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Nobre	87-7	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	MN 599	C1	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	MN 599	C9	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 43	C7	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 43	C10	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	Embrapa 43	C11	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	MN 656	C8	<i>Azospirillum lipoferum</i>
Estirpes isoladas de milho	MN 656	C13A	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	MN 656	C13B	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	BK 9505	18A	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	BK 9505	18B	<i>Herbaspirillum</i> sp.
	BK 9505	10B	<i>Azospirillum</i> sp.

<sup>1</sup> Os isolados foram obtidos a partir de raízes esterilizadas.

Fonte: Candaten (1997); Lima (1997); Martin (1997).



