

Isolamento, Caracterização e Seleção de Estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* Associadas a Diferentes Variedades de Milho Cultivadas no Cerrado



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 206

Isolamento, Caracterização e Seleção de Estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* Associadas a Diferentes Variedades de Milho Cultivadas no Cerrado

Fábio Bueno dos Reis Junior
Cynthia Torres de Toledo Machado
Altair Toledo Machado
Iêda de Carvalho Mendes
Angela Mehta

Planaltina, DF
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Fernanda Vidígal Cabral de Miranda*

Equipe de Revisão: *Fernanda Vidígal Cabral de Miranda*

Francisca Elijani do Nascimento

Jussara Flores de Oliveira Arbues

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro*

Editoração eletrônica: *Renato Berlim Fonseca*

Capa: *Renato Berlim Fonseca*

Foto da Capa: *Leo Miranda*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Alexandre Moreira Veloso

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2008): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

185 Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado / Fábio Buenos dos Reis Júnior... [et. al]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2008.

36 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; 206).

1. Microbiologia do solo. 2. Fixação biológica de nitrogênio.
3. Milho. I. Reis Júnior, Fábio Bueno dos Santos. II.Série.

631.4 - CDD 21

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão.....	16
Conclusões.....	32
Referências	32

Isolamento, Caracterização e Seleção de Estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* Associadas a Diferentes Variedades de Milho Cultivadas no Cerrado

*Fábio Bueno dos Reis Junior*¹; *Cynthia Torres de Toledo Machado*²; *Altair Toledo Machado*³; *Iêda de Carvalho Mendes*⁴; *Angela Mehta*⁵

Resumo

Foram avaliadas variedades de milho quanto à disponibilidade de N no solo e suas associações com *Azospirillum* spp., além do isolamento e pré-seleção de estirpes de *A. amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* para trabalhos com inoculação. Representantes dos isolados bacterianos foram avaliados quanto à atividade da nitrogenase e produção de ácido indol-acético e, com base nos resultados, inoculados em sementes da variedade Sol da manhã para avaliação da promoção do crescimento das plantas. As variedades MC5 e MC10 se destacaram na maioria dos atributos avaliados. No entanto, não houve diferenças entre as variedades quanto à população de bactérias diazotróficas associadas às suas raízes. A co-inoculação dos isolados LIV 205 (*A. amazonense*) e HIV 301a (*H. seropedicae*) promoveu maior crescimento das plantas.

Termos para indexação: *Zea mays*, fixação biológica de nitrogênio, promoção de crescimento de plantas.

¹ Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Cerrados, fabio@cpac.embrapa.br

² Engenheira Agrônoma, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Cerrados, cynthia@cpac.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Cerrados, altair@cpac.embrapa.br

⁴ Engenheira Agrônoma, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Cerrados, mendesi@cpac.embrapa.br

⁵ Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Cenargen, amehta@cenargen.embrapa.br

Isolation, Characterization and Selection of *Azospirillum amazonense* and *Herbaspirillum seropedicae* Strains Associated with Different Maize Varieties Cultivated at the Cerrado

Abstract

Maize varieties were evaluated regarding soil N availability and its association with Azospirillum spp., besides isolation and pre-selection of A. amazonense and Herbaspirillum seropedicae strains for inoculation studies. A group of bacterial isolates was evaluated regarding their nitrogenase activity and indol-acetic acid production and, based in the results, some isolates were inoculated in seeds of “Sol da manhã” variety to evaluate plant growth promotion. The varieties MC5 and MC10 received best evaluation in most part of the assessed parameters. Nevertheless, there were no differences among varieties regarding the diazotrophic bacterial population associated with their roots. The co-inoculation of isolates LIV 205 (A. amazonense) and HIV 301a (H. seropedicae) promoted higher growth of the seedlings.

Index terms: Zea mays, biological nitrogen fixation, plant growth promotion.

Introdução

O milho no Brasil tem grande importância social, econômica e cultural, sendo cultivado em aproximadamente 12 milhões de hectares, em sua maioria por pequenos e médios agricultores (SOARES et al., 1998; MONTEIRO, 1995). Essa cultura sofre frequentemente com problemas de estresse ambiental, entre eles podemos destacar a baixa fertilidade dos solos, dos quais mais de 80 % apresentam deficiência de nitrogênio (N) (HAAG, 1987).

De forma geral, para se minimizar o efeito do estresse ambiental, a identificação, a seleção e o uso de variedades mais tolerantes à deficiência de N, mais eficientes na aquisição desse elemento e que formem associações com bactérias diazotróficas e/ou promotoras de crescimento, faz-se necessário. Sabe-se que existem interações entre o N e os efeitos de bactérias diazotróficas/promotoras de crescimento na assimilação e utilização desse nutriente. Variações entre genótipos de milho na resposta ao N (ALFOLDI et al., 1992) são descritas, bem como a variabilidade das interações planta – microrganismos, geralmente dependente dos genótipos dos macro e microsimbiontes (SALOMONE et al., 1996).

Entre os microrganismos diazotróficos encontrados em associações com cereais e gramíneas, as espécies de *Azospirillum* constituem um dos grupos mais bem estudados atualmente, sendo numerosos os trabalhos sobre sua ecologia, fisiologia e genética (BALDINI et al., 1997; BASHAN; HOLGUIN, 1997). A interação positiva entre essas bactérias diazotróficas/promotoras de crescimento e o milho tem sido demonstrada por vários autores e, embora ainda não se constitua em prática agrícola consolidada, levantamentos de diversos experimentos conduzidos em vários países mostram que a inoculação com *Azospirillum* resultou, na maioria dos casos, em aumento de produção e/ou de matéria seca e acúmulo de N nas plantas inoculadas, particularmente quando envolveu genótipos não melhorados em presença de baixa disponibilidade de N (SALOMONE et al., 1996; OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994; OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

Embora o gênero *Azospirillum* seja constituído de sete espécies, a quase totalidade dos experimentos de inoculação, feitos em mais de 20 anos, refere-se a *A. brasilense*, seguida de *A. lipoferum*, com apenas alguns poucos trabalhos conduzidos no Brasil usando estirpes de *A. amazonense* (BALDANI et al., 1999). Estudos envolvendo a espécie *A. amazonense* são interessantes, pois, entre suas características, destaca-se a adaptabilidade ao pH ácido (BALDANI et al., 1997), comum à maioria dos solos brasileiros.

Herbaspirillum seropedicae tem muitas características similares ao gênero *Azospirillum*, inclusive a habilidade de crescer em meio NFb semi-sólido (BALDANI et al., 1986). No entanto, a fixação de nitrogênio por essa bactéria é mais tolerante ao O₂ e baixo pH do que aquelas do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER, 1992). Quanto ao aspecto ecológico, *Herbaspirillum seropedicae* tem sido isolado de vários cereais e gramíneas forrageiras, assim como de fruteiras e palmeiras (BALDANI et al., 1986; DÖBEREINER et al., 1993; WEBER et al., 1999; FERREIRA et al., 1995), enquanto *H. rubrisubalbicans* parece associar-se com um número mais restrito de espécies como a cana-de-açúcar, o sorgo e gramíneas do gênero *Miscanthus* (OLIVARES et al., 1996; JAMES; OLIVARES, 1997; KIRCHHOF et al., 1997). Uma das características mais importantes dessas espécies é a baixa sobrevivência no solo (OLIVARES et al., 1996).

No Brasil, principalmente na região do Cerrado, poucos estudos têm focado as interações entre genótipos de milho, N e bactérias diazotróficas/promotoras de crescimento. O avanço no estudo dessas interações pode permitir a identificação de estratégias a serem utilizadas para aumentar a eficiência de uso e diminuir a dependência do nitrogênio fertilizante na cultura do milho, incrementando a sua produção e reduzindo efeitos nocivos ao meio-ambiente. A maximização da eficiência do uso de nutrientes pela combinação ou adaptação do requerimento das plantas aos problemas dos solos, em vez de vencer as limitações destes pela aplicação, por vezes inadequada, de fertilizantes e corretivos, é uma meta a ser alcançada pela pesquisa envolvendo abordagens multi e interdisciplinares.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar e caracterizar variedades de milho quanto à resposta à disponibilidade de N no solo e suas associações com bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* e isolar e pré-selecionar estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a plantas de milho para futuros trabalhos com inoculação.

Material e Métodos

Estudo 1: Avaliação de diferentes variedades em ensaios de competição a campo

Diferentes variedades de milho foram avaliadas em um ensaio de competição na área experimental da Embrapa Cerrados, em Planaltina, DF. Foram utilizadas oito variedades de milho entre variedades locais e variedades melhoradas, a saber:

- 1) Eldorado: população de grãos dentados, amarelos com segregação para branco com predomínio da raça Tuxpeño, com oito ciclos de seleção visando maior eficiência na utilização de N (MACHADO et al., 1992).
- 2) Sol da manhã: população de grãos duros, alaranjados com segregação para branco, com predomínio das raças Cateto, Eto e Duros do Caribe, também com oito ciclos de seleção visando maior eficiência na utilização de N (MACHADO et al., 1992).
- 3) BR 106: população de grãos dentados, amarelos, formado a partir de três cultivares brasileiros (Maya, Centralmex e Dentado Composto) e uma introdução exótica (Tuxpeño 1) (NASPOLINI FILHO et al., 1981).
- 4) MC 10: material experimental, população de grãos semidentados e de coloração amarela, formado a partir do cruzamento entre a variedade Eldorado com a variedade local Campeão, com o objetivo de se obter uma variedade de grãos dentados, produtiva e com potencial para eficiência no uso de P.

- 5) BR 451: população de ciclo precoce, de grãos brancos, semidentados, com alta qualidade protéica, derivada da população 64 QPM do Cimmyt. A farinha de seus grãos apresenta excelentes propriedades para mistura com farinha de trigo para utilização na indústria de pães e massas.
- 6) BRS 4150: população de ciclo precoce, de grãos amarelos, semiduros, desenvolvida por seleção recorrente intrapopulacional no Composto Veja Precoce, com excelente adaptação à Região Sul do Brasil.
- 7) MC 4: material experimental, população de grãos duros e de coloração alaranjada, formado a partir do cruzamento entre a variedade BRS 4157 com a variedade local Pedra Dourada com o objetivo de formar uma variedade produtiva, de porte baixo e com grãos semiduros.
- 8) MC 5: material experimental, população de grãos semidentados e de coloração amarela, formado a partir do cruzamento entre a variedade Eldorado com a variedade local Caiano de Sobrália com o objetivo de se obter uma variedade de grãos dentados, produtiva e com potencial para eficiência no uso de fósforo.

A adubação da área foi feita de acordo com os resultados da análise de solo e foram adicionados, como tratamentos, dois níveis de N, um baixo e um alto (correspondendo, respectivamente, a 20 kg N ha^{-1} e 120 kg N ha^{-1}).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com os tratamentos dispostos em fatorial (8 variedades x 2 níveis de N), com 3 repetições. A parcela experimental foi constituída de duas fileiras de 5 metros, espaçadas entre si por 1 metro. Após o desbaste, foi mantido um estande final de 50 plantas por parcela.

Após a colheita, foi determinada a altura das plantas e da inserção das espigas, produção de grãos e palha (folhas e colmos), a

umidade dos grãos e os conteúdos de N, P e Zn das plantas (SILVA, 1999).

Os índices de eficiência de utilização Pg/Np (Produção de grãos / Nutriente na planta) e Pg/Ng (Produção de grãos / Nutriente nos grãos) de N, P e Zn, adaptados de Moll et al. (1982), foram estimados, sendo que o primeiro avalia a eficiência de utilização dos nutrientes para a produção de grãos (kg de grãos kg^{-1} de N, P ou Zn acumulado na planta) e o segundo avalia a produção de grãos por unidade do nutriente nos grãos (kg de grãos kg^{-1} de N, P ou Zn acumulado nos grãos). O índice de eficiência de translocação, Ng/Np (Nutriente nos grãos / Nutriente nas plantas), avalia a fração total do nutriente na planta que é translocado para os grãos (kg de N, P ou Zn acumulado nos grãos kg^{-1} de N, P e Zn acumulado na planta).

A estimativa do número de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. em associação com as raízes das plantas foi determinada pelo método descrito por Döbereiner et al. (1995). Foram utilizados dois meios de cultivo semi-sólidos sem adição de nitrogênio. Um deles foi o meio LGI para isolamento de *Azospirillum amazonense* e o outro o meio NFb, que é semi-seletivo para o isolamento de *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*. Amostras de 10 g de raízes (matéria fresca) foram lavadas com água corrente, trituradas em 90 mL de solução salina e diluídas serialmente, de 10^{-2} até 10^{-7} . De cada diluição, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e inoculadas nos frascos com meio de cultura. Os frascos foram incubados a 30 °C e após 5 dias o crescimento bacteriano foi avaliado verificando-se o aparecimento de película característica. O número populacional foi obtido com o uso da tabela de Mc Crady, tomando-se por base o número de frascos positivos em cada diluição.

Os frascos com crescimento positivo, na mais alta diluição de cada um dos meios, foram utilizados para repicagem para um novo meio semi-sólido. Após a incubação, retiraram-se alíquotas que foram observadas ao microscópio de contraste de fase para a verificação da morfologia das células. Para purificação final e isolamento,

esses mesmos frascos foram utilizados para riscagem em placas com meio sólido, o mesmo do semi-sólido, acrescidos de extrato de levedura.

Os procedimentos estatísticos constaram de análise de variância com aplicação do teste F e testes de separação de médias. Os resultados foram analisados com a utilização do software MSTAT-C, versão 2.10 (MSTAT Director, Michigan State University).

Estudo 2: Caracterização de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum* spp. isolados de diferentes variedades de milho

Neste trabalho, buscamos confirmar a classificação dos isolados, feita inicialmente com base em características morfológicas das células sob microscopia ótica de contraste de fase e de colônias em meio sólido semi-específico de acordo com Döbereiner et al. (1995). Os isolados caracterizados morfológicamente como *Herbaspirillum* foram testados para utilização de N-acetil-glucosamina e meso-eritritol como fontes de carbono. De acordo com Döbereiner et al. (1995), essas fontes podem ser utilizadas para a separação das espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*.

O perfil de proteínas totais de um número representativo de isolados foi analisado utilizando-se o método descrito por Jackman (1985). As proteínas foram submetidas a SDS-PAGE e seu perfil visualizado após revelação com prata (BLUM et al., 1987).

A diversidade entre alguns isolados de *Herbaspirillum* ainda foi analisada utilizando-se a metodologia de ERIC-PCR de acordo com Rademaker e De Bruin (1996).

Com os resultados obtidos com o perfil de proteínas e ERIC-PCR, duas matrizes binárias foram construídas, compreendendo o universo total das bandas observadas nos géis resultantes de cada uma dessas metodologias. Para cada posição de migração das diferentes bandas, foram atribuídos os valores de 1 ou 0, indicando a presença

ou ausência de uma determinada banda. Os padrões de migração gerados para cada isolado foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard (ROHLF, 2000), em que $J = A/(N-D)$, sendo "A" o número de combinações com a presença dos fragmentos menos as combinações de ausência dos fragmentos, "D" o número de combinações de ausência de fragmentos e "N" o número de combinações possíveis. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias (BUSSABE et al., 1990) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-PC, VERSÃO 2.1, EXETER SOFTWARE, USA).

A produção de ácido-indolacético (IAA) por isolados de *Herbaspirillum* e *A. amazonense* foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995) com algumas modificações. Culturas de células crescidas durante 24 horas a 30 °C em meio JNFb, para *H. seropedicae*, contendo 0,1 % de NH_4Cl ou LGI, para *A. amazonense*, contendo 0,1 % de KNO_3 (ambos sem extrato de levedura, biotina e azul de bromotimol), tiveram sua densidade óptica ajustada para 0,5 a 500 nm. Foram adicionados 2 mL dessa suspensão a 28 mL de meio de crescimento, o mesmo JNFb ou LGI acrescidos de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano filtrado em "millipore" ($0,2 \mu\text{m}$), dispostos em erlenmeyers de 50 mL. Foram utilizadas três repetições para cada isolado. Os erlenmeyers foram incubados no escuro durante 72 horas a 30 °C. Após esse período, para a análise de auxinas, as culturas foram ajustadas para 10^8 células mL^{-1} a 436 nm de absorvância com água estéril. Posteriormente essas células foram filtradas com a utilização de filtros "millipore" com malha de $0,2 \mu\text{m}$. Uma alíquota de $150 \mu\text{L}$ do material filtrado foi aplicada em poços de microplacas de poliestireno (capacidade para $300 \mu\text{L}$ poço⁻¹), devendo reagir com $100 \mu\text{L}$ do reagente de Salkowisk (1mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5M em 50mL de HClO_4 35 %). Após incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, observou-se a formação de uma cor rósea, e as leituras de absorvância foram realizadas utilizando um espectrofotômetro BIO-RAD modelo 3550 (Laboratórios Bio-Rad, California, EUA)

dotado de um filtro de interferência de 492 nm. A concentração de AIA pôde ser estimada com uma curva preparada utilizando-se 0 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM , 300 μM , 350 μM de autêntico AIA.

Também foram investigadas as variações na habilidade de fixação biológica de nitrogênio entre os isolados de diferentes variedades de milho. Esses estudos foram feitos com a utilização da metodologia de redução de acetileno em cultura pura (HAN; NEW, 1998). Cinquenta microlitros de inóculo, crescidos em meio Dygs durante 24 horas a 30 °C e com densidade ótica ajustada para 1,0 nm a 436 nm, foram transferidos para frascos com volume total de 10 mL contendo 5 mL de meio de cultura semi-sólido sem adição de nitrogênio e indicador (azul de bromotimol). Esses frascos foram incubados a 30 °C durante 72 horas, e após esse período suas rolhas de algodão foram trocadas por tampas de borracha (tipo "suba seal") esterilizadas. Com a utilização de uma seringa, 10 % da fase gasosa dos frascos foi substituída por gás acetileno. Após 1 hora de incubação, a redução do acetileno a etileno, reação governada pela enzima nitrogenase, foi estimada pela injeção de 0,5 mL de amostra gasosa dos frascos em um cromatógrafo de gás Perkin Elmer, utilizando uma coluna Porapak N (2 mm x 3 mm) a 110 °C e detecção por meio de chama ionizante na presença dos gases hidrogênio e ar comprimido, com nitrogênio sendo utilizado como gás de arraste.

Trinta e sete isolados de *A. amazonense* e *Herbaspirillum* spp. foram avaliados neste trabalho (Tabela 1a). Para efeito de comparação, estirpes padrão das bactérias diazotróficas *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* também foram incluídas neste estudo (Tabela 1b).

Tabela 1. Isolados de *A. amazonense* e *Herbaspirillum* spp. provenientes de diferentes variedades de milho (a) e estirpes padrão de bactérias diazotróficas (b) utilizadas neste trabalho.

(a) Variedades de milho		(b) Espécie/Estirpe		Planta
Eldorado	LIV102a, LIV102b, LIII102a, LIII102c, LIII102b	<i>A. lipoferum</i>		
	LIV101b, LIII 205,	Sp59 ^T (ATCC 29707)		Trigo
Sol da manhã	LIV101, LIV101a, HIV301b	brasilenseSp7 ^T (ATCC 29145)		<i>Digitaria decumbens</i>
MC10	LIV112c, LIV308b, LIII112a, LIV112a, LIII112b, LIV308a, LIV112b	<i>A. amazonense</i> Y2 ^T (ATCC 35120)		<i>Hypparrhenia rufa</i>
	LIII203a, LIV111a, LIV111b, LIV303a, LIV203, LIII203b, LIV303b	<i>H. rubrisubalbicans</i> M4 ^T (ATCC 19308)		Cana-de-açúcar
MC4		<i>H. seropedicae</i> Z67 ^T (ATCC 35892)		Arroz
MC5	LIV211, LIV314			
BR451	LIV313, HIV206, HIII313a, HIII206a, HIII206b, HIII313c, HIII313b, HIII313d			
	HIII311b, HIII311a, HIV201b			
BR106				

L - *Azospirillum amazonense*

H - *Herbaspirillum*.

Estudo 3: Seleção de estirpes para trabalhos de inoculação

Após os trabalhos de isolamento e avaliações anteriores, instalaram-se dois experimentos em casa de vegetação, inoculando-se 1 mL por semente das estirpes de *A. amazonense* e *H. seropedicae*, previamente crescidas (10^8 células mL⁻¹) em meios de cultura líquida LGI e NFB (DÖBEREINER et al., 1995), respectivamente. Essas estirpes foram selecionadas de acordo com a avaliação de AIA, escolhendo

estirpes de maior (LIV111a, LIV 205, HIV301a) e menor (LIV112a, HIII313b) produção desse promotor de crescimento de acordo com resultados do estudo anterior. A variedade de milho utilizada neste estudo foi a Sol da manhã. Vasos de 1 litro foram preenchidos com mistura de areia e vermiculita (2:1) estéreis e, em cada vaso, foram mantidas duas plantas. Semanalmente aplicou-se, por vaso, 40 mL de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1951) sem nitrogênio, e a umidade do substrato foi mantida em torno da capacidade de campo com irrigações periódicas.

No primeiro experimento, com delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, os tratamentos foram divididos em um controle sem inoculação, três tratamentos inoculados com diferentes estirpes de *A. amazonense* (LIV111a, LIV 205, LIV112a) e dois inoculados com diferentes estirpes de *H. seropedicae* (HIV301a, HIII313b). No segundo experimento, com quatro repetições, foram acrescentados um tratamento de co-inoculação com estirpes de *A. amazonense* e *H. seropedicae* (LIV 205 + HIV301a) e um tratamento inoculado com uma estirpe padrão de *A. brasilense* (Sp7). A estirpe Sp7 de *A. brasilense* está entre as mais utilizadas em experimentos envolvendo inoculação de gramíneas (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

No primeiro experimento, os parâmetros avaliados, 20 dias após o plantio, foram as massas secas da parte aérea e raízes. No segundo experimento, ainda foram avaliados a área foliar e o conteúdo total de nitrogênio das plantas.

Resultados e Discussão

Estudo 1: Avaliação de diferentes variedades em ensaios de competição

O aumento na dose de N aplicada resultou em uma maior produção média de grãos e palha, sendo que as variedades diferiram entre si (Tabela 2). Destacaram-se, pela maior produção de grãos, as variedades BR 106, Eldorado, BRS 4150, MC 5 e MC10, cujo rendimento médio refletiu o comportamento apresentado nas doses baixa e alta de N. A variedade

experimental MC 5 foi a mais produtiva na menor dose de N e se apresentou menos responsiva ao aumento da dose, enquanto a BR 106 foi a mais produtiva na dose mais elevada e também a que mais respondeu ao aumento na dose de N fornecida. Na produção de palha, destacaram-se MC 5, BR 106 e MC 10.

Plantas mais altas, em média, foram observadas na maior dose de N, porém não houve efeito da adubação para a altura de inserção das espigas (Tabela 3). Eldorado, BRS 4150 e MC 10 foram as variedades mais altas. BRS 4150 também apresentou a inserção da espiga mais elevada, junto com a variedade MC 5.

O aumento na dose de N resultou também em maior acúmulo de N, P e Zn nos grãos e de N na palha (Tabelas 4, 5 e 6). A maior ou menor disponibilidade de N pode exercer efeito na assimilação de P e Zn, e interações sinérgicas entre esses nutrientes já foram identificadas na cultura do milho (DHILLON et al., 1983; LONERAGAN; WEBB, 1993). Redução significativa no conteúdo de P e Zn na palha foi observada em decorrência da aplicação da dose de N mais elevada (Tabelas 5 e 6). Houve diferença entre as variedades apenas para o conteúdo de Zn na palha, quando MC 5, MC 10 e BR 106 apresentaram os maiores valores.

Tabela 2. Produção de grãos e palha de variedades de milho submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada, baixo (20 kg ha⁻¹) e alto (120 kg ha⁻¹).

Variedades	Produção de grãos (kg/ha)			Produção de palha (kg/ha)		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	4683	6600	5642 c	5300	6880	6090 d
Eldorado	6103	8820	7462 ab	6173	7687	6930 bcd
BR 106	6293	10963	8628 a	7003	8503	7753 ab
BR 451	6117	7160	6638 bc	6323	6240	6282 cd
BRS 4150	6347	9623	7985 ab	6830	7310	7070 bc
MC 5	7117	8773	7945 ab	7807	8313	8060 a
MC 4	5820	7910	6865 bc	6257	7323	6790 bcd
MC 10	5520	9090	7305 ab	6603	8147	7375 ab
Média	6000 B	8618 A		6537 B	7551 A	

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, respectivamente, pelo teste de Duncan e pelo teste F a 5 % de probabilidade.

Tabela 3. Altura das plantas e da inserção das espigas das variedades de milho submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada, baixo (20 kg ha⁻¹) e alto (120 kg ha⁻¹).

Variedades	Altura de plantas (m)			Altura da espiga (m)		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	2,28	2,28	2,28 d	1,19	1,13	1,16 d
Eldorado	2,49	2,70	2,60 a	1,35	1,49	1,42 b
BR 106	2,51	2,49	2,50 b	1,45	1,39	1,42 b
BR 451	2,21	2,27	2,24 d	1,15	1,16	1,15 d
BRS 4150	2,53	2,57	2,55 ab	1,47	1,51	1,49 a
MC 5	2,47	2,47	2,47 bc	1,40	1,46	1,43 ab
MC 4	2,38	2,46	2,42 c	1,29	1,42	1,35 c
MC 10	2,61	2,59	2,60 a	1,47	1,37	1,42 b
Média	2,43 B	2,48 A		1,35	1,37	

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si, respectivamente, pelo teste de Duncan e pelo teste F a 5 % de probabilidade.

Tabela 4. Acumulação de N nos grãos e na palha de variedades de milho submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada, baixo (20 kg ha⁻¹) e alto (120 kg ha⁻¹).

Variedades	Conteúdo de N nos grãos (kg/ha)			Conteúdo de N na palha (kg/ha)		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	70,20	103,35	86,78	30,94	49,85	40,39
Eldorado	76,20	131,72	103,96	32,54	61,89	47,22
BR 106	88,00	179,76	133,88	39,96	62,61	51,28
BR 451	97,42	111,90	104,66	37,14	47,40	42,27
BRS 4150	94,25	145,29	119,77	39,57	58,32	48,95
MC 5	95,12	148,97	122,05	40,24	65,55	52,90
MC 4	84,96	125,02	104,99	34,48	56,27	45,38
MC 10	78,83	152,16	115,49	35,66	53,68	44,67
Média	85,62 B	137,27 A		36,32 B	56,95 A	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.

Tabela 5. Acumulação de P nos grãos e na palha de variedades de milho submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada, baixo (20 kg ha⁻¹) e alto (120 kg ha⁻¹).

Variedades	Conteúdo de P nos grãos (kg/ha)			Conteúdo de P na palha (kg/ha)		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	26,81	37,79	32,30	10,06	5,28	7,67
Eldorado	31,49	47,30	39,40	9,53	6,28	7,91
BR 106	36,76	59,18	47,97	14,61	5,81	10,21
BR 451	34,32	33,39	33,86	13,62	4,62	9,12
BRS 4150	36,17	47,12	41,64	13,45	5,99	9,72
MC 5	36,10	46,64	41,37	14,79	6,60	10,70
MC 4	31,53	43,99	37,76	10,10	5,21	7,66
MC 10	31,06	45,27	38,17	15,24	11,51	13,38
Média	33,03 B	45,09 A		12,68 A	6,41 B	

Médias seguidas pelas mesmas não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.

Tabela 6. Acumulação de Zn nos grãos e na palha de variedades de milho submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada, baixo (20 kg ha⁻¹) e alto (120 kg ha⁻¹).

Variedades	Conteúdo de Zn nos grãos (kg/ha)			Conteúdo de Zn na palha (kg/ha)		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	0,17	0,20	0,19	0,100	0,077	0,088 b
Eldorado	0,19	0,25	0,22	0,110	0,077	0,093 b
BR 106	0,23	0,30	0,26	0,153	0,077	0,115 ab
BR 451	0,20	0,18	0,19	0,153	0,047	0,100 b
BRS 4150	0,23	0,25	0,24	0,117	0,073	0,095 b
MC 5	0,21	0,24	0,23	0,150	0,073	0,112 ab
MC 4	0,18	0,22	0,20	0,120	0,070	0,095 b
MC 10	0,19	0,22	0,21	0,163	0,137	0,150 a
Média	0,20 B	0,23 A		0,133 A	0,079 B	

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas ns linhas, não diferem entre si, respectivamente, pelo teste de Duncan e pelo teste F a 5 % de probabilidade.

À medida que se aumentou a dose de N aplicada, observou-se uma menor eficiência de utilização do N para a produção de grãos, bem como uma redução no índice de eficiência de utilização de N que avalia a produção de grãos por unidade de nutriente nos grãos (Tabela 7). O aumento na dose de N não resultou em maior translocação desse nutriente para os grãos. Segundo Fernandes et al. (2005), geralmente, os aproveitamentos de N decrescem com o aumento das doses aplicadas, em vista de o suprimento desse nutriente exceder as necessidades da cultura.

O aumento na dose de N promoveu uma maior eficiência de utilização do P para a produção de grãos e uma maior eficiência na translocação do P absorvido para os grãos (Tabela 8). Para o índice de eficiência de utilização de P não houve efeito das doses de N.

Tabela 7. Índices de eficiência de utilização (Pg/Np e Pg/Ng) e translocação (Ng/Np) de N das variedades de milho submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada, baixo (20 kg ha⁻¹) e alto (120 kg ha⁻¹).

Variedade	Pg/Np			Pg/Ng			Ng/Np		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	46,12	43,78	44,95	67,07	64,74	65,91	0,69	0,68	0,68
Eldorado	56,25	45,81	51,03	80,89	67,64	74,26	0,70	0,68	0,69
BR 106	49,22	46,02	47,62	71,97	62,80	67,38	0,69	0,74	0,71
BR 451	46,28	45,23	45,76	64,16	64,13	64,14	0,72	0,71	0,71
BRS 4150	47,98	47,09	47,54	67,56	66,02	66,79	0,71	0,71	0,71
MC 5	52,73	40,88	46,80	75,10	58,83	66,97	0,70	0,69	0,70
MC 4	49,41	44,37	46,89	69,89	64,24	67,06	0,71	0,69	0,70
MC 10	48,13	44,00	46,06	70,18	59,90	65,04	0,69	0,74	0,71
Média	49,51 A	44,65 B		70,85 A	63,54 B		0,70	0,70	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.

Tabela 8. Índices de eficiência de utilização (Pg/Np e Pg/Ng) e translocação (Ng/Np) de P das variedades de milho submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada, baixo (20 kg ha⁻¹) e alto (120 kg ha⁻¹).

Variedade	Pg/Np			Pg/Ng			Ng/Np		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	126,28	155,62	140,95	175,71	177,25	176,48	0,72	0,88	0,80
Eldorado	149,62	164,74	157,18	196,42	186,39	191,41	0,76	0,88	0,82
BR 106	123,17	171,16	147,16	171,66	188,92	180,29	0,72	0,91	0,81
BR 451	127,25	196,35	161,80	178,62	228,09	203,36	0,71	0,87	0,79
BRS 4150	127,83	183,27	155,55	175,14	207,56	191,35	0,73	0,88	0,81
MC 5	137,98	167,20	152,59	191,25	191,30	191,28	0,72	0,88	0,80
MC 4	139,96	163,24	151,60	185,30	182,08	183,69	0,76	0,90	0,83
MC 10	119,00	161,14	140,07	177,60	199,91	188,75	0,67	0,80	0,74
Média	131,39B	170,34A		181,46	195,19		0,72 B	0,88 A	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.

Todos os índices de eficiência para Zn foram aumentados pela adição da dose de N mais elevada (Tabela 9). Os aspectos mais estudados dessa interação tratam do efeito controverso dos sais de nitrogênio aumentando ou aliviando as deficiências de Zn e alterando o transporte e redistribuição do Zn entre as partes das plantas (LONERAGAN; WEBB, 1993).

Tabela 9. Índices de eficiência de utilização (Pg/Np e Pg/Ng) e translocação (Ng/Np) de Zn das variedades de milho submetidas a dois níveis de adubação nitrogenada, baixo (20 kg ha⁻¹) e alto (120 kg ha⁻¹).

Variedade	Pg/Np			Pg/Ng			Ng/Np		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	17601,2	24301,6	20951,4	28483,7	33906,1	31194,9	0,62	0,72	0,67
Eldorado	20566,1	26845,4	23705,8	33555,6	35132,1	34343,8	0,63	0,77	0,70
BR 106	16597,9	29592,8	23095,4	28468,3	37746,2	33107,3	0,60	0,79	0,70
BR 451	17254,7	32866,9	25060,8	30055,8	42607,0	36331,4	0,56	0,78	0,68
BRS 4150	18549,8	29695,2	24122,5	28016,1	38658,7	33337,4	0,66	0,77	0,72
MC 5	19754,4	28428,6	24091,5	33786,7	37390,8	35588,7	0,59	0,76	0,67
MC 4	19196,9	27762,4	23479,6	32015,9	36674,8	34345,3	0,60	0,76	0,68
MC 10	15548,5	25941,56	20745,0	29237,4	40510,5	34873,9	0,53	0,64	0,58
Média	18133,7B	28179,3A		30452,4B	37828,3A		0,60B	0,75A	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.

Na Fig. 1, observa-se a distribuição de bactérias diazotróficas isoladas (104 bactérias foram isoladas no total) em associação com as diferentes variedades de milho avaliadas neste experimento.

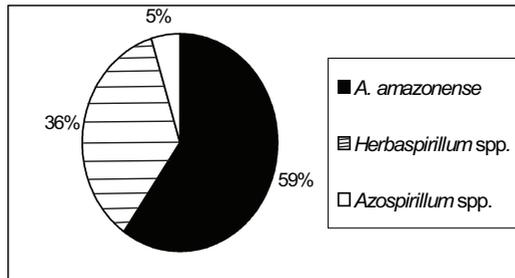


Fig. 1. Porcentagem de isolados de bactérias diazotróficas identificadas em associação com as diferentes variedades de milho.

Foram utilizados, neste trabalho, apenas os meios semi-sólidos e semi-específicos para isolamento de *Azospirillum* spp. (NFb) e *A. amazonense* (LGI) (DÖBEREINER et al., 1995). No entanto, um número significativo de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, que cresceram no meio NFb, foi isolado. Ao final do trabalho de isolamento, o número de bactérias do gênero *Herbaspirillum* obtido foi bem superior àquelas pertencentes a *Azospirillum* spp. (*A. brasilense* e *A. lipoferum*) (Fig. 1). Provavelmente, as colônias bastante características de *Herbaspirillum* spp. e *A. amazonense*, o que torna seu isolamento mais fácil quando comparado ao de outras bactérias (ex.: *A. brasilense* e *A. lipoferum*), tenham influenciado na obtenção da maior porcentagem de isolados dessas bactérias. Entretanto, mesmo que a presença de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, em associação com plantas de milho, já tenha sido relatada em outros trabalhos (BALDANI et al., 1986; OLIVARES et al., 1996), não esperávamos que o número de isolados obtidos, utilizando-se o meio NFb, fosse superior aos isolados de *Azospirillum* spp.

A adubação nitrogenada, de maneira geral, apresentou efeito negativo em relação ao número de bactérias diazotróficas encontradas, ou seja, a dose mais alta reduziu a população desses microrganismos associados ao sistema radicular das plantas (Tabela 10).

O efeito negativo de elevadas doses de fertilizantes nitrogenados sobre populações de bactérias diazotróficas já foi relatado anteriormente (REIS JUNIOR et al., 2000). Esse fato pode ser prejudicial à cultura, já que a interação positiva entre bactérias diazotróficas e o milho tem sido demonstrada por vários autores (OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

Pode-se observar que não existiram diferenças significativas em relação à população de bactérias (Tabela 10) encontradas entre as diferentes variedades de milho avaliadas. Isso indica que as diferenças na eficiência nutricional entre diferentes variedades de milho não estão correlacionadas à população destes microrganismos e que, provavelmente, devem ser resultado de uma gama de fatores genéticos, bioquímicos e fisiológicos envolvendo tanto os macro quanto os microsimbiontes.

Tabela 10. Número de bactérias diazotróficas crescidas nos meios NFb e LGI associadas a diferentes variedades de milho.

Variedade	Nº bactérias (log)/g matéria fresca raiz			Nº bactérias (log)/g matéria fresca raiz		
	Meio NFb			Meio LGI		
	Baixo N	Alto N	Média	Baixo N	Alto N	Média
Sol da manhã	6,02	4,14	5,08	5,82	4,80	5,31
Eldorado	7,41	4,13	5,77	7,07	3,95	5,51
BR 106	5,04	4,67	4,85	5,99	4,55	5,27
BR 451	5,03	3,72	4,37	5,93	4,36	5,15
BRS 4150	6,46	4,90	5,68	5,39	4,14	4,77
MC 5	4,49	5,21	4,85	4,62	4,49	4,55
MC 4	5,26	4,02	4,64	4,29	3,93	4,11
MC 10	5,70	5,41	5,56	5,55	4,81	5,18
Média	5,68 A	4,52 B		5,58 A	4,38 B	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.

Estudo 2: Caracterização de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum* spp. isolados de diferentes variedades de milho

Os testes de assimilação de N-acetil-glucosamina e meso-eritritol mostraram que todos os isolados de *Herbaspirillum* foram capazes de utilizar a primeira, mas não a segunda fonte de carbono (Fig. 2 e Tabela 11), o que é característica da espécie *H. seropedicae*, já encontrada em associação com plantas de milho (OLIVARES et al., 1996).



Fig. 2. Teste de assimilação de meso-eritritol (M - M4) e N-acetil-glucosamina (N - Z67, HIV 206, HIII313D) por isolados de *Herbaspirillum* spp. A presença de película, na superfície do meio semi-sólido, indica o crescimento bacteriano e, conseqüentemente, a assimilação da fonte de carbono.

Tabela 11. Utilização de N-acetil-glucosamina e meso-eritritol por isolados de *Herbaspirillum* spp. provenientes de raízes de milho e as estirpes padrão de *H. seropedicae* (Z67) e *H. rubrisubalbicans* (M4).

Isolado/Estirpe	N-acetil-glucosamina	Meso-eritritol
Z67	+	-
M4	-	+
HIV 301b	+	-
HIV 206	+	-
HIII 313a	+	-
HIII 206a	+	-
HIII 206b	+	-
HIII 313c	+	-
HIII 313b	+	-
HIII 313d	+	-
HIII 311b	+	-
HIII 311a	+	-
HIV 201b	+	-

Baseado nos perfis de proteínas totais (Fig. 3), os isolados de *A. amazonense* mostraram alta similaridade, agrupando-se com a estirpe padrão Y2 (Fig. 4). Dessa maneira, as avaliações morfológicas feitas previamente foram confirmadas.

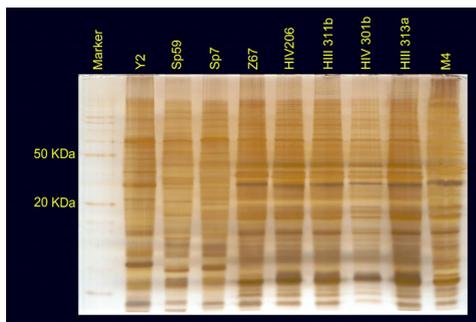


Fig. 3. Análise SDS-PAGE de estirpes padrão de bactérias diazotróficas e isolados de *Herbaspirillum* spp. provenientes de diferentes variedades de milho.

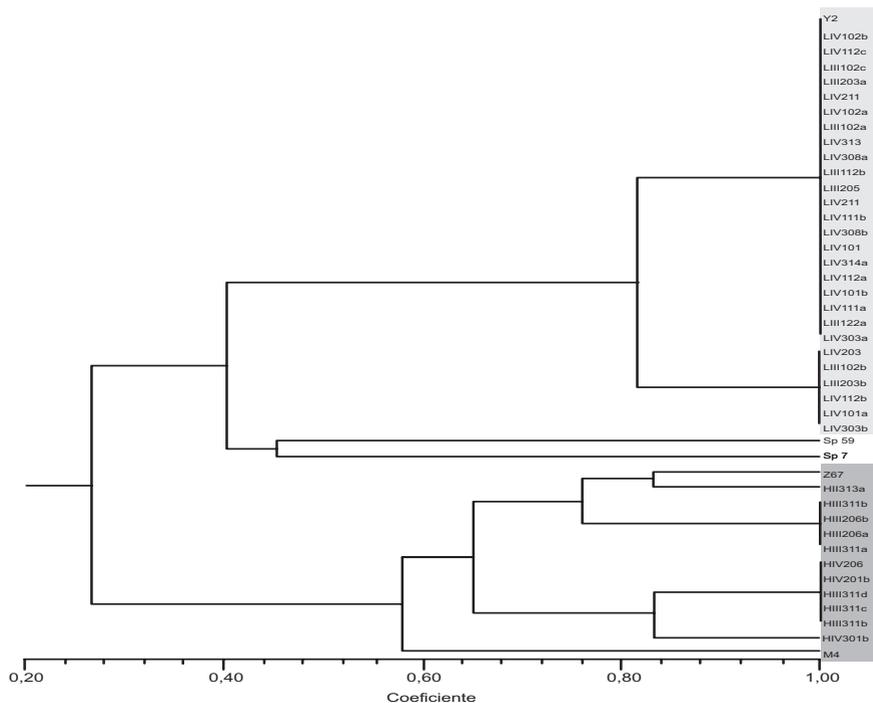


Fig. 4. Dendrograma de similaridade baseado nos perfis de proteínas totais de estirpes padrão de bactérias diazotróficas e isolados de *A. amazonense* and *Herbaspirillum* provenientes de diferentes variedades de milho. O coeficiente de Jaccard foi aplicado e a matriz foi construída pelo método UPGMA.

Já as bactérias *Herbaspirillum* spp. mostraram maior diversidade, apesar de um menor número de isolados ter sido avaliado. Entretanto, observando as estirpes padrão utilizadas e os isolados avaliados, um melhor agrupamento, com no mínimo 65 % de similaridade, foi obtido com Z67, a estirpe padrão de *H. seropedicae*, e em menor grau com a estirpe M4 (58 % de similaridade), pertencente à espécie *H. rubrisubalbicans* (Fig. 4).

As análises de ERIC-PCR (Fig. 5) confirmaram os resultados obtidos com os perfis de proteínas para *Herbaspirillum* spp. Contudo, o dendrograma construído a partir dos resultados de ERIC-PCR apresentou uma maior diversidade comparativamente ao que foi apresentado pelos resultados envolvendo as análises de perfis de proteínas. Utilizando essa metodologia, a similaridade entre os isolados e a estirpe padrão de *H. seropedicae* (Z67) partiu de apenas 32 % (isolados HIII 313b e HIV 206) até um máximo de 80 % (isolado HIII 313a) (Fig. 6). Esse comportamento pode evidenciar, no nível intra-específico, uma grande diversidade genética entre os isolados. De acordo com Bull et al. (2000), técnicas como a RFLP-PCR, RAPD, REP-PCR e ERIC-PCR podem ser indicadas para estudos de diversidade intra-específica, aquela que compreende a diversidade apresentada abaixo do nível de espécie, em que é avaliada a diversidade de subespécies ou estirpes pertencentes a uma mesma espécie.

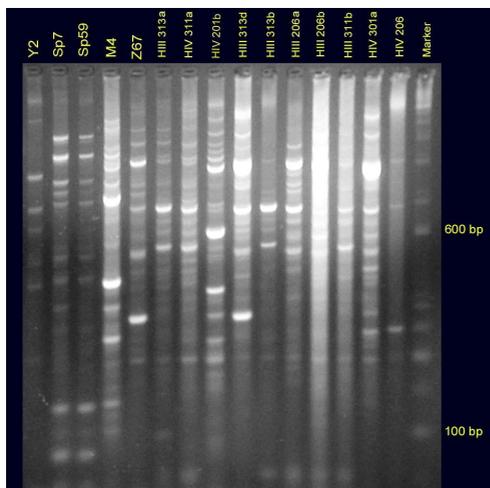


Fig. 5. ERIC-PCR de estirpes padrão de bactérias diazotróficas e isolados de *Herbaspirillum* provenientes de diferentes variedades de milho.

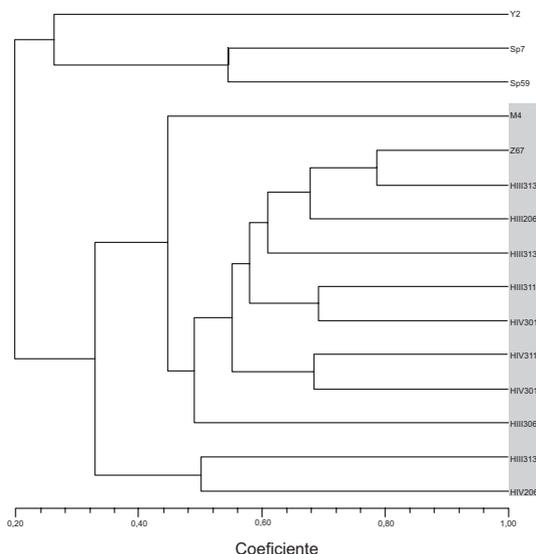


Fig. 6. Dendrograma de similaridade baseado nos perfis de ERIC-PCR de estirpes padrão de bactérias diazotróficas e isolados de *Herbaspirillum* provenientes de diferentes variedades de milho. O coeficiente de Jaccard foi aplicado e a matriz foi construída pelo método UPGMA.

Apesar de a fixação biológica de nitrogênio por *Azospirillum* ter sido foco da comunidade científica por muitos anos, existem evidências crescentes de que grande parte da contribuição de bactérias desse gênero para as plantas deve-se a produção de hormônios. Okon e Labandera-Gonzalez (1994) citam que a fixação de nitrogênio por *Azospirillum* apresenta importância agrônômica significativamente reduzida em relação ao que se pensava no passado.

Em virtude da importância da produção de AIA por bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, alguns isolados oriundos da associação com raízes de milho tiveram sua capacidade de produção deste hormônio avaliada. Todos os isolados testados foram capazes de produzir AIA (Fig. 7a e Fig. 7b). A quantidade de AIA produzida variou entre os isolados, com valores que foram desde 35 μM (LIII 308b) a 190 μM (HIII 313c). Vale destacar a estirpe padrão de *A. lipoferum* (Sp59), com uma produção de 340 μM . Radwan (1999) também mostrou grande variabilidade entre isolados de *Azospirillum* quanto à produção de AIA, com valores variando de 19,2 μM – 432 μM .

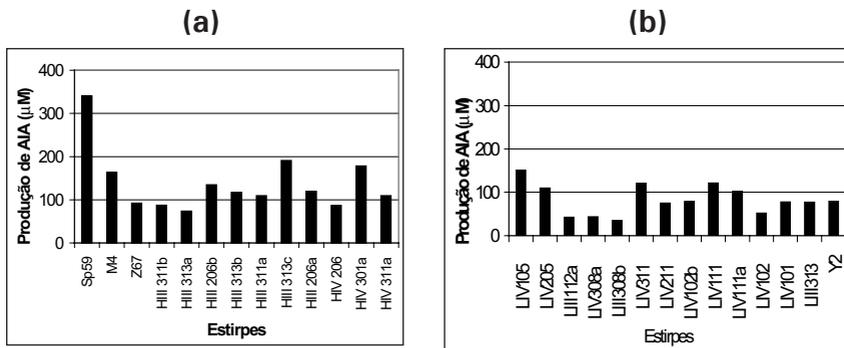


Fig. 7. Produção de AIA por estirpes padrão de *Azospirillum lipoferum* (Sp59), *Herbaspirillum rubisubalbicans* (M4) e *H. seropedicae* (Z67) e isolados de *H. seropedicae* oriundos de raízes de milho (a). Produção de AIA pela estirpe padrão de *Azospirillum amazonense* (Y2) e isolados desta mesma espécie oriundos de raízes de milho (b). Os valores são médias de três repetições.

Para confirmar a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico pelos isolados de raízes de milho, estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum* tiveram sua atividade da nitrogenase averiguada pela metodologia de redução de acetileno. Foram testadas 9 estirpes de *Herbaspirillum* e 10 estirpes de *A. amazonense*. Todos os isolados apresentaram capacidade de reduzir o acetileno e foi constatada pequena variação da atividade da nitrogenase entre os isolados de *Herbaspirillum* (61,9 a 78,1 nmol C₂H₄ h⁻¹ frasco⁻¹) e *A. amazonense* (93,1 a 149,2 nmol C₂H₄ h⁻¹ frasco⁻¹) (Fig. 8). Essa magnitude de valores e a variação na capacidade de *Azospirillum* spp. fixar N atmosférico observada entre membros de populações naturais foi constatada também por Han e New (1998).

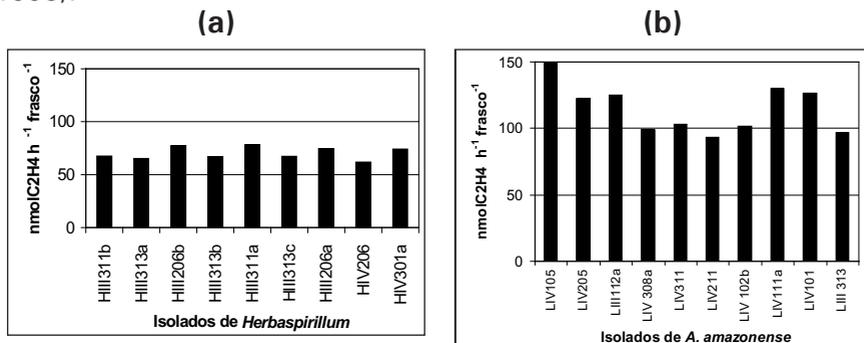


Fig. 8. Atividade de redução de acetileno (atividade da nitrogenase) em estirpes de *Herbaspirillum* spp. (a) e *A. amazonense* (b) isoladas de raízes de milho. Os valores são médias de três repetições.

Estudo 3: Seleção de estirpes para trabalhos de inoculação

No primeiro experimento, o tratamento inoculado com a estirpe LIV 205 de *A. amazonense* destacou-se diante dos demais tratamentos, produzindo maior matéria seca da parte aérea (39 %) e de raízes (42 %) quando comparado ao controle não inoculado (Tabela 12). Quando os estudos com as associações entre plantas e *Azospirillum* tiveram seu início, acreditava-se que os benefícios obtidos eram essencialmente derivados da fixação biológica de nitrogênio (DOBELAERE et al., 2001), no entanto estudos posteriores demonstraram que os efeitos positivos proporcionados por esses microrganismos são, principalmente, derivados de alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes das plantas inoculadas, o que leva a um incremento na absorção de água e nutrientes (OKON; VANDERLEYDEN, 1997). Provavelmente, a maior produção de matéria seca e acúmulo de nutrientes por plantas inoculadas seja devido à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias. Bashan e Holguin (1997) relatam que é óbvio que fitormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretados por *Azospirillum*, desempenham um papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral.

Tabela 12. Matéria seca de parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) de plantas de milho, 20 dias após o plantio, sob diferentes tratamentos de inoculação.

Inoculação	MSPA (g)	MSR (g)
Controle não inoculado	0,62 BC	0,55 B
LIV111a	0,50 C	0,48 B
LIII112a	0,59 BC	0,56 B
LIV205	0,86 A	0,78 A
HIV301a	0,70 ABC	0,59 B
HIII131b	0,77 AB	0,77 A
Probabilidade	0,011	0,027
CV%	15,11	18,47

Os valores seguidos de mesma letra não se diferem pelo teste LSD 5 %.

No segundo experimento, plantas co-inoculadas com os isolados LIV 205 de *A. amazonense* + HIV 301a de *H. seropedicae* apresentaram maior produção de matéria seca da parte aérea quando comparado aos outros tratamentos, com exceção daquelas inoculadas com a estirpe Sp7. Para esse parâmetro, o tratamento com a co-inoculação mostrou um incremento 38 % superior ao controle não inoculado (Tabela 13).

A produção de raízes seguiu o mesmo comportamento, porém as plantas co-inoculadas superaram até mesmo aquelas inoculadas com a estirpe Sp7. O incremento da co-inoculação em relação ao controle não inoculado para a massa seca de raízes foi de 41 % (Tabela 13).

Apesar de não significativas, as diferenças apresentadas para a área foliar mostram uma tendência de que o tratamento inoculado com isolados das duas espécies (*A. amazonense* + *H. seropedicae*) seja superior aos demais. Verificou-se, nesse caso, um incremento de 33 % sobre o controle (Tabela 13).

Apenas o tratamento de co-inoculação com isolados das espécies *A. amazonense* + *H. seropedicae* apresentou uma quantidade de N acumulado estatisticamente superior (24,5 %) ao controle. O aumento nos teores de N em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas é comumente relatado, podendo ser resultado tanto da fixação biológica de nitrogênio, quanto dos mecanismos de promoção do crescimento, que podem incrementar a capacidade das plantas em absorver esse nutriente (DOBBELAERE et al., 2001).

Os resultados deste trabalho destacam o melhor desempenho das plantas co-inoculadas com isolados de espécies diferentes. Na literatura, existem poucos trabalhos comparando inoculações simples com co-inoculações envolvendo diferentes espécies promotoras de crescimento vegetal. Portanto, sugere-se que, em testes futuros visando seleção de estirpes, tanto em experimentos de casa de vegetação quanto no campo, deve-se trabalhar também com a co-inoculação.

Tabela 13. Matéria seca de parte aérea (MSPA) e raízes (MSR), área foliar (AF) e conteúdo de nitrogênio de plantas de milho, 20 dias após o plantio, sob diferentes tratamentos de inoculação.

Inoculação	MSPA (g)	MSR (g)	AF (cm ²)	Conteúdo de N (mg)
Controle não inoculado	0,64 C	0,81 BC	138,25	12,65 B
LIV111a	0,68 BC	0,89 BC	134,43	13,94 AB
LIII112a	0,58 C	0,78 C	127,18	12,22 B
LIV205	0,55 C	0,90 BC	115,81	12,06 B
HIV301a	0,67 BC	0,94 B	128,61	12,69 B
HHI313b	0,61 C	0,92 BC	161,91	11,95 B
LIV 205 + HIV 301a	0,88 A	1,14 A	184,35	15,75 A
Sp7	0,80 AB	0,87 BC	157,83	13,72 AB
Probabilidade	0,0022	0,0016	n.s.	0,0266
CV%	15,41	10,92	21,82	11,68

Os valores seguidos de mesma letra não se diferem pelo teste LSD 5 % n.s. - não significativo.

Este trabalho foi importante para que fossem reiniciados os estudos envolvendo bactérias fixadoras de nitrogênio e/ou promotoras de crescimento de plantas, em associação com gramíneas, na Embrapa Cerrados. Hoje temos em nosso banco de germoplasma mais de 100 estirpes de *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* que poderão ser utilizadas em estudos futuros. Além disso, foram apresentados resultados interessantes, confirmando o potencial da inoculação com *A. amazonense* e/ou *Herbaspirillum seropedicae*, que devem ser confirmados com novos experimentos em ambiente controlado e, principalmente, em condições de campo. Projetos envolvendo a utilização de bactérias desses grupos na cultura do milho e do trigo estão em andamento e em breve daremos início aos primeiros experimentos com a cultura da cana-de-açúcar.

Conclusões

As variedades experimentais MC5 e MC10 foram aquelas que obtiveram destaque na maioria dos atributos avaliados. No entanto, não houve diferenças entre as variedades em relação à população de bactérias diazotróficas avaliadas associadas as suas raízes.

As análises do perfil de proteínas totais e de ERIC-PCR mostraram significativa diversidade genética entre os isolados de *Herbaspirillum*.

A co-inoculação dos isolados LIV 205 de *A. amazonense* e HIV 301a de *H. seropedicae* promoveu maior crescimento das plantas em ensaio de casa de vegetação.

Referências

- ALFOLDI, Z.; PINTER, L.; FEIL, B. Accumulation and partitioning of biomass and soluble carbohydrates in maize seedlings as affected by source of nitrogen, nitrogen concentration and cultivar. **Journal of Plant Nutrition**, Madison, v. 15, p. 2567-2583, 1992.
- BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. de; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA, 1999. p. 621-666.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-98, 1987.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 573-606, 2000.

BUSSABE, W. O.; MIAZAKI, É. S.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamentos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA. 9., 1990, São Paulo. **Resumos**. São Paulo: USP, 1990.

DHILLON, K. S.; YAGODEEN, B. A.; PLESHKOV, A. C. Micronutrients and nitrogen metabolism. I. Effects of different levels of micronutrients on nitrogen constituents in maize plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 73, p. 355-363, 1983.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 871-879, 2001.

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

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

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; PAULA, M. A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: INTERNATIONAL CONGRESSES ON NITROGEN FIXATION, 9., 1992, Cancun. **New horizons in nitrogen fixation: proceedings**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 671-676. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 17).

FERNANDES, F. C. S.; BUZZETTI, S.; ARF, O.; ANDRADE, J. A. C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, p. 195-204, 2005.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Programme and abstracts**. Viçosa: JARD, 1995. p. 210-211.

HAAG, H. P. A Nutrição mineral e o ecossistema. In: CASTRO, P. R. C. (Ed.). **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Potafos, 1987. p. 49-70.

HAN, S. O.; NEW, P. B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 193-201, 1998.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA: University of California, 1951. 32 p. (California Agriculture Experiment Station. Circular, 347).

JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. (Ed.). **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic Press, 1985. p. 115-129.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 17, p. 77-119, 1997.

KIRCHHOF, G.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 45-55, 1997.

LONERAGAN, J. F.; WEBB, M. J. Interactions between zinc and other nutrients affecting the growth of plants. In: ROBSON, A. D. (Ed.). **Zinc in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 119-134.

MACHADO, A. T.; MAGALHÃES, J. R.; MAGNAVACA, R.; SILVA, M. R. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 4, p. 45-47, 1992.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p. 562-564, 1982.

MONTEIRO, J. A. Estresse ambiental: considerações econômicas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1995. p. 13-40.

NASPOLINI FILHO, V.; GOMES, E. E.; VIANNA, R. T.; MÔRO, J. R. General and specific combining ability for yield in a diallel cross among 18 maize populations. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 4, p. 571-577, 1981.

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

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v. 63, p. 364-370, 1997.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominatly of Graminae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.

RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUJN, F. J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. (Ed.). **DNA markers: protocols, applications and overviews**. Weinheim: Wiley-VCH, 1996.

RADWAN, T. EL-SAYED EL-DESOK. **Improvement of quality of some crop plants by applying new concepts in biotechnology with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp.** 1999. Tese (Doutorado) - Cairo University, Cairo.

REIS JÚNIOR, F. B.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* Spp.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 219, p. 153-159, 2000.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1: user guide**. New York: State University of New York, 2000.

SALOMONE, I. G. de; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 193-196, 1996.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 282-285, 1995.

SILVA, F. C. da (Org.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Rio de Janeiro: Embrapa Solos; Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1999. 370 p.

SOARES, A. C.; MACHADO, A. T.; SILVA, B. M.; VON DER WEID, J. M. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: ASPTA, 1998. 185 p.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple. **Plant and Soil**, The Hague, v. 210, p. 103-113, 1999.