

Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033)

ANDRÉIA APARECIDA DE OLIVEIRA SILVA

Mestranda em Biotecnologia – UMC;

Professora dos cursos de Ciências Biológicas, Enfermagem, Fisioterapia e Nutrição – UNINOVE.

andreasilva@uninove.br

TAÍS ARRUDA FELIPE

Mestranda em Biotecnologia – UMC.

ERNA ELISABETH BACH

Pesquisadora e professora do curso de Química – UNICASTELO;

Professora credenciada do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia – UMC;

Professora do curso de Enfermagem – UNINOVE.

ernabach@uol.com.br

RESUMO

Sementes de trigo e de cevada foram transferidas para tubos contendo terra e inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio, o *Azospirillum brasilense* Sp7. Aumentos significativos foram encontrados no tamanho e diâmetro das raízes primárias e secundárias das plantas inoculadas, quando comparadas com as sadias, indicando alteração na morfologia do sistema radicular com aumento da superfície de contato para a retirada de água e nutrientes para a planta, além de fixar o nitrogênio mais facilmente. Outro fato observado na reação de resistência foi o efeito de elicitor contra doença causada por *Bipolaris sorokiniana*.

Palavras-chave: '*Azospirillum brasilense*'. Cevada. Elicitor. Trigo.

ABSTRACT

Wheat seeds and barley were transferred for tubes containing earth and inoculated with bacterial capable to fix nitrogen, the *Azospirillum brasilense* Sp7. Significant increases were found in the size and diameter of the primary and secondary roots of the inoculated plants when compared with the healthy ones indicating alteration in the morphology of the root system with increase of the contact surface for the retreat of water and nutritious for the plant besides fastening the nitrogen more easily. Another fact was in the resistance reaction observed as elicitor effect against disease caused by *Bipolaris sorokiniana*.

Key words: '*Azospirillum brasilense*'. Barley. Elicitor. Wheat.

Recebido em: 16 mar. 2004

Aprovado em: 5 abr. 2004

Introdução

Alguns microrganismos podem usar o nitrogênio molecular da atmosfera como fonte nitrogenada. A essa conversão do nitrogênio molecular em compostos nitrogenados dá-se o nome de fixação de nitrogênio. Entre os microrganismos simbióticos que fixam nitrogênio associado com raízes de plantas, podem ser citados o gênero *Rhizobium* (que coloniza nódulos de raízes de leguminosas), o gênero *Frankia* (presente nos nódulos de raízes de não leguminosas) e a espécie *Azotobacter paspali* (na gramínea *Paspalum notatum*) (SELDIN, 1982). Johanna Döbereiner (1966) encontrou, na rizosfera da grama batatais (*Paspalum notatum*), uma nova bactéria, isolada e identificada como *Azospirillum brasilense*. Nos anos seguintes, foram isoladas de cana-de-açúcar e cereais (milho, arroz e sorgo) três novas espécies de *Azospirillum* que não somente colonizavam a rizosfera, mas também apresentavam certas estirpes capazes de infectar a planta, fornecendo o nitrogênio de forma mais eficiente (BALDANI; DÖBEREINER, 1980). As bactérias desse gênero são gram-negativas, espiriladas e estão presentes em todos os tipos de solo com diâmetro de 1 micrômetro (μm) e o comprimento de 2,1 a 3,8 μm .

Assim, o uso do *Azospirillum* tem despertado grande interesse por parte de pesquisadores em biologia e fertilidade do solo, uma vez que, quando associadas à rizosfera de plantas podem contribuir para a nutrição nitrogenada delas. Segundo Okon; Vanderleyden (1997), a otimização da possível simbiose entre *Azospirillum* spp e plantas poderá resultar em incrementos de produtividade e em diminuição dos custos de produção, principalmente com a aquisição de adubos nitrogenados.

Diante disso, o presente trabalho visa avaliar a ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (IAC-24) e cevada (CEV 95033), além de se observar a reação perante o patógeno *Bipolaris sorokiniana*.

Material e Método

1. Desenvolvimento do *Azospirillum*

A cepa de *Azospirillum brasilense* Sp7 foi enviada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pertencente à coleção de culturas da Dra. Johanna Döbereiner.

A bactéria liofilizada foi transferida para o meio líquido; após sete dias, foi repicada (cerca de 1 mililitro [mL]) para tubos de ensaio contendo o mesmo meio e colocada para crescimento durante três dias, à temperatura ambiente de aproximadamente 25° C. O *Azospirillum brasilense* Sp7 foi mantido em meio *tryptic soy broth* (TSB) (*tryptic soy broth*, da marca Difco = 30 gramas (g); *bacto tryptone* = 17 g; *bacto soytone* = 3 g; *bacto-dextrose* = 2,5 g; cloreto de sódio = 5 g; fosfato dipotássio = 2,5 g) e identificado pelo teste de Gram. As bactérias foram mantidas em geladeira até o uso posterior. Para a identificação e confirmação da bactéria, realizou-se o teste de Gram.

2. Padronização das suspensões

As bactérias foram inoculadas em meio líquido e incubadas a 37°C durante 48 horas. Em seguida, depois de feitas as diluições de 1/10, 1/50 e 1/100, foram semeadas na quantidade de 0,01 mL de cada diluição, em placas contendo o meio TSB, e incubadas a 37°C durante 48 horas. Após esse período, fez-se a leitura em espectrofotômetro, em absorbância de 500 nanômetro (nm), e contadas as colônias (Unidades Formadoras de Colônias [UFC]) observadas nas placas.

Com as determinadas leituras no espectrofotômetro e as contagens das colônias, foi criado um gráfico em escala logarítmica, sendo determinada a melhor concentração para o uso nos experimentos.

3. Preparação das plantas de trigo e cevada

Em tubos de ensaio contendo terra estéril sem adubo, foram adicionados 5 mL de solução de Hoagland (nutrientes básicos) e 5 mL de água para que, somente no terceiro dia fossem colocadas as sementes de trigo ou cevada.

As sementes de trigo (IAC-24 doadas pelo Instituto Agrônomo, Campinas – SP) e as sementes de cevada (CEV 95033, oriundas da Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária – [FAPA], Guarapuava – PR)¹ foram desinfestadas com lavagem na solução de hipoclorito de sódio 0,05% e, em seguida, com água destilada estéril. Depois de secas em papel de filtro estéril, foram transferidas para os tubos contendo terra acompanhada de 5 mL de água estéril ou 5 mL da suspensão de bactérias (conforme Tabela 1).

Tabela 1 – Relação dos tratamentos das plantas de trigo e cevada submetidas a inoculação com *Azospirillum brasilense*.

tratamentos de plantas	número de tubos	material aplicado
trigo-controle	5	água destilada
trigo-meio	5	meio TSB
trigo-azospirillum (1/50)	5	<i>Azospirillum brasilense</i> na concentração 1/50 (correspondente a 2,22; 10 ⁸ colônias)
trigo-azospirillum (1/100)	5	<i>Azospirillum brasilense</i> na concentração 1/100 (correspondente a 0,53; 10 ⁸ colônias).
cevada-controle	5	água destilada
cevada-meio	5	meio TSB
cevada-azospirillum (1/50)	5	<i>Azospirillum brasilense</i> na concentração 1/50 (correspondente a 2,22; 10 ⁸ colônias)
cevada-azospirillum (1/100)	5	<i>Azospirillum brasilense</i> na concentração 1/100 (correspondente a 0,53; 10 ⁸ colônias)

O processo seguinte exigiu que os tubos fossem transferidos para ambiente escuro incubados e, só após a germinação das sementes,

para luz total. Passados 15 dias, fizeram-se as observações adicionando-se, a cada três dias 2 mL de água. As plântulas foram submetidas a medidas de parte aérea, raiz e total, e os dados avaliados por análise das médias dos tratamentos comparados pelo Teste T a 5% (ORIGIN). Todo o experimento foi repetido cinco vezes.

Em outro lote de tubos, as plantas de trigo e cevada, após 15 dias do tratamento com *Azospirillum brasilense*, foram inoculadas por aspersão com o fungo *Bipolaris sorokiniana* (patógeno de trigo e de cevada na concentração de 10⁴ conídios), transferidas para câmara úmida e escura, por 24 horas e, depois, para luz total por mais quatro dias. Após esse período, observou-se a presença de lesão. Um grupo de plantas sem tratamento utilizado como controle foi pulverizado com suspensão de conídios de *Bipolaris sorokiniana*.

Resultado e Discussão

Granade et al. (1990) demonstrou que a fertilização pode reduzir a incidência de doenças em trigo e que a concentração de nitrogênio tem sido requerida para conservar certa quantidade de proteínas nas sementes, mantendo-se a saúde das plantas. Assim, todo o nitrogênio requerido pela planta deverá vir de fertilizantes, com a ressalva de que aquelas que vivem em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio podem utilizá-los em menor quantidade.

Vários autores vêm estudando o efeito do *Azospirillum* (bactéria fixadora de nitrogênio) devido a sua habilidade de converter o nitrogênio atmosférico em amônia. Observa-se, em campo, que a inoculação com a suspensão de bactéria tem beneficiado várias plantas (BALDANI; DÖBEREINER, 1980; BALDANI et al., 1983; ECKERT et al., 2001; KAPULINIK et al., 1985a, b; KHAMMAS et

¹Agradecimentos ao Engenheiro Agrônomo Noemir Antomiazzi pelo envio das sementes de cevada.

al., 1989; OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994; REINHOLD et al., 1987).

No presente projeto, a suspensão do *Azospirillum brasilense* foi padronizada por meio da contagem de colônias e leitura no espectrofotômetro, sendo utilizadas, com maior precisão, duas concentrações nos tratamentos, como 1/50 (apresentando $2,22 \cdot 10^8$ UFC) e 1/100 (apresentando $0,53 \cdot 10^8$ UFC). Para a confirmação da bactéria *Azospirillum brasilense*, realizou-se o teste de Gram demonstrando a forma de espirilo com cor vermelha (gram-negativa), em conformidade com Magalhães et al. (1983) e Holguin et al. (1999).

Para entender o efeito de fixação de nitrogênio, o primeiro passo foi observar o desenvolvimento das plantas associado à bactéria. Michiels et al. (1989) e Umali-Garcia et al. (1980) observaram que o *Azospirillum* apresentou a colonização intercelular, com o aumento da superfície das raízes, enquanto no *Rhizobium* a colonização foi intracelular, ocorrendo formação de nódulos.

Diante do descrito, os resultados preliminares do presente trabalho demonstraram que as raízes das plantas de cevada e trigo não apresentaram nódulos, mas um aumento da superfície das raízes. Nessa comparação, observaram-se diferenças entre a densidade de raízes secundárias e sua emergência das principais. Em relação às raízes secundárias, as plantas tratadas apresentaram menor número e maior superfície de contato, após uma distância de 200 μm , enquanto as plantas-controle produziram maior número de raízes secundárias desordenadas e mais finas (Figuras 1, 2, 3).

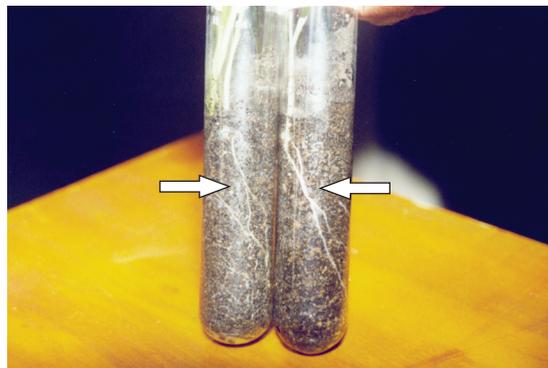


Figura 1 – Plantas de trigo e/ou cevada germinando em tubos de ensaio contendo solo. Tubo da esquerda, planta-controle; e tubo da direita, inoculada com *Azospirillum brasilense* (planta-azospirillum). Setas indicam superfície das raízes.

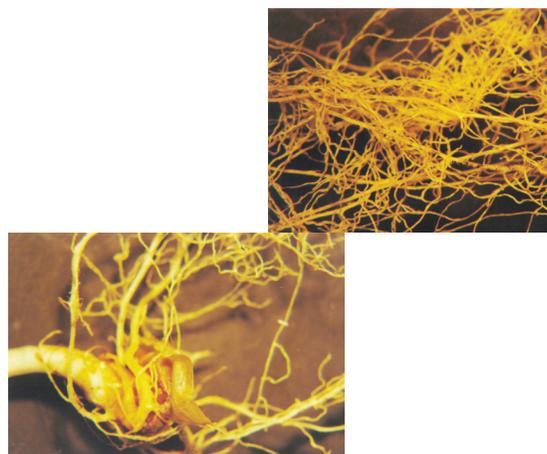


Figura 2 – Observação em lupa de uma semente de trigo controle desenvolvida em solo normal. Várias raízes, primárias e secundárias, são formadas na semente. Aumento no esteriomicroscópio de 200 vezes.



Figura 3 – Observação em lupa da semente de trigo desenvolvida em solo e inoculada com *Azospirillum brasilense*. Observam-se, a partir da semente, duas raízes mais grossas como principais e, depois, as secundárias. Aumento no esteriomicroscópio de 200 vezes.

Outro fator importante foi o tamanho das plantas. A média dos tratamentos em que ocorreu a inoculação com *Azospirillum* foi significativamente diferente daquela em que não houve inoculação. No caso de suspensão mais concentrada de *Azospirillum*, observou-se maior desenvolvimento das plantas (Tabela 2).

Tabela 2 – Tamanho das partes aéreas, raiz e total das plantas de trigo e cevada referentes aos tratamentos com inoculação de *Azospirillum brasilense*.

experimentos	aérea	raiz	total	aérea (%)	raiz (%)
trigo-controle	25,30 a*	19,05 a*	44,3 a*	100**	100
trigo-meio	23,65 a	20,25 a	43,9 a	93,47	103,84
trigo-azospirillum (1/50)	33,35 c	25,65 c	59,0 c	131,80	131,50
trigo-azospirillum (1/100)	28,05 b	27,15 b	55,2 b	110	139,20
cevada-controle	16 a	10,10 a	26,1 a	100	100
cevada-meio	15,9 a	10,10 a	26,0 a	99,40	100
cevada-azospirillum (1/100)	20,90 b	11,80 b	32,7 b	130,60	116,80
cevada-azospirillum (1/50)	25,4 c	13,2 c	38,6 c	158,75	130,70

* Média de cinco repetições de sete plantas cada, medida em centímetros (cm). Resultados seguidos de letras diferentes (a, b, c), entre os experimentos verticais, foram significativamente diferentes em nível de 5% ($P >= 0,05$) (Teste T).
 ** Porcentagem do efeito nas plantas, observando aérea e raiz.

Esses resultados demonstram que o *Azospirillum brasilense* apresentou o efeito nas raízes das plantas de trigo e cevada, quando desenvolvidas em solo pobre de nutrientes, causando alterações na morfologia do sistema radicular e o aumento não apenas do número de radicelas, mas também do diâmetro das raízes laterais e adventícias ou raízes primárias e secundárias. Ocorreu também alongação da zona para a formação das raízes primária e secundária, promovendo, assim, um aumento no total do tamanho da raiz e planta (parte aérea) e um maior desenvolvimento em consonância com os resultados encontrados com sorgo e uma variedade de trigo do Canadá, conforme descrito por Kapulnik et al., 1985b; Lin et al., 1983. Observe a Figura 4.

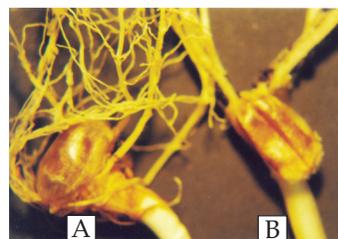


Figura 4 – Observação em lupa da semente de cevada desenvolvida em solo.

A) semente cevada-controle.

B) semente de cevada inoculada com *Azospirillum brasilense* (cevada-azospirillum).

Observam-se, a partir da semente, raízes finas no controle e mais espessas na inoculada. Aumento no esteriomicroscópio de 250 vezes.

Após 15 dias de desenvolvimento das referidas plantas-controle e plantas tratadas com *Azospirillum* (plantas-azospirillum), as folhas foram submetidas à pulverização com o patógeno *Bipolaris sorokiniana*, observando-se, depois de mais uma semana, o aparecimento ou não dos sintomas. Todas as folhas das plantas-controle apresentaram lesões típicas do patógeno do trigo ou da cevada, não constatadas nas folhas das plantas tratadas com *Azospirillum* nas duas concentrações. Isso confirmou que as plantas tratadas apresentaram resistência ao patógeno e que as bactérias atuaram como elicitores de resistência (Figura 5).

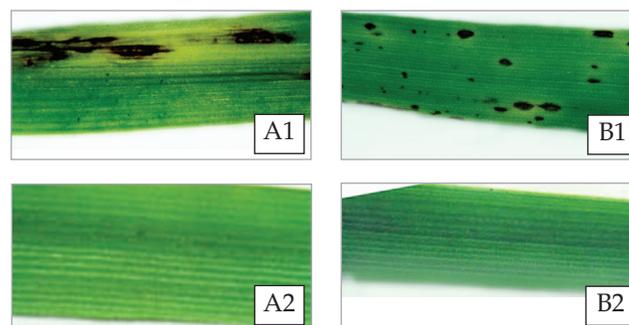


Figura 5 – Folhas de cevada infectadas (A1) e submetidas ao tratamento com *Azospirillum brasilense* (A2), e folhas de trigo infectadas (B1) e submetidas ao tratamento com *Azospirillum brasilense* (B2). Aumento no esteriomicroscópio de 150 vezes.

Segundo Okon; Vanderleyden (1997), baseando-se em dados acumulados durante 22 anos de pesquisa com experimentos de inoculação em campo, de pequenas áreas, descreveram que o gênero *Azospirillum* spp aumentou o rendimento em importantes culturas, embora ressaltem que o ganho vai mais além do que o simples fixar biologicamente o nitrogênio, pois também auxilia na ampliação da superfície de absorção das raízes da planta e, conseqüentemente, do volume de substrato do solo explorado. Como mecanismo de ação, pelo menos parte ou talvez muitos desses efeitos do *Azospirillum* spp nas plantas possam ser atribuídos à produção, pela bactéria, de substâncias promotoras de crescimento, entre elas auxinas, giberilinas e citocininas, e não somente à fixação biológica de nitrogênio.

Mesmo com resultados excelentes, as dificuldades existem, isto é, para que isso seja transportado para campo, faz-se necessário ter uma grande quantidade de bactéria para colonizar plantas situadas no campo experimental, levando em conta as variadas condições de clima e solo.

Observando-se os resultados, o presente trabalho veio demonstrar o efeito da bactéria no metabolismo das plantas, desenvolvendo o efeito como elicitador de resistência, sendo de grande importância no controle de doença foliar causada por *Bipolaris sorokiniana*, além de promover o desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, a superfície da raiz.

Conclusão

As plantas de trigo e cevada tratadas com *Azospirillum* não apresentaram lesões típicas do patógeno. Isso veio demonstrar que a bactéria interferiu no metabolismo da planta, induzindo a resistência, além de promover o seu desenvolvimento e o da raiz.

Referências

- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of '*Azospirillum*' inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, n. 29, p. 924-929. Canadá: 1983.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with '*Azospirillum*' spp. *Soil biology and biochemistry*, n. 12, p. 1-18. Austrália: 1980.
- DÖBEREINER, J. '*Azobacter Papali*' sp. Uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de paspalum. *Revista de Pesquisa em Agropecuária*, n. 1, p. 357-365. Brasil: EMBRAPA, 1966.
- ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. '*Azospirillum*' doebereineriae sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the c4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n. 51, p. 17-26. Nova York: 2001.
- GRANADE, G. V.; SWEENEY, D. W.; WILLIS, W. G.; EVERSMEYER, M. G.; WHITNEY, D. A.; BONCZKOWSKI, L. C. Increasing yield and reducing disease on wheat with P and K fertilization. *Better Crops*, p. 26-30. Atlanta: 1990.
- HOLGUIN, G.; PATTERN, C. L.; GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of '*Azospirillum*'. *Biology and fertility of Soils*, n. 29, p. 10-23. Nova York: 1999.
- KAPULNIK, Y. R.; GAFNY, OKON, Y. Effect of '*Azospirillum*' spp. inoculation on root development and no₂-uptake in wheat ('*Triticum aestivum* cv. Miriam') in hydroponic systems. *Canadian Journal of Botany*, n. 63, p. 627-631. Canadá: 1985b.
- KAPULNIK, Y. R.; OKON, Y.; HENIS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by '*Azospirillum*' inoculation. *Canadian Journal of Microbiology*, n. 31, p. 881-887. Canadá: 1985a.
- KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. (1989) '*Azospirillum irakense*' sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*, n. 140, p. 679-693. Paris: 1989.
- LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R. W. Enhanced mineral uptake by 'zea mays' and 'sorghum bicolor' roots inoculated with *azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 45, p. 1775-1779. Nova York: 1983.
- MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, n. 55, p. 417-429. Brasília, DF: 1983.

MICHELIS, K. J.; VANDERLEYDEN, J.; VAN GOOL, A. 'Azospirillum' – plant associations: a review. *Biology and Fertility of Soils*, n. 8, p. 356-368. Nova York: 1989.

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

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated 'Azospirillum' species can stimulate plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 7, p. 366-370. Nova York: 1997.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. 'Azospirillum halopraeferans' sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass ('Leptochloa fusca') (L. Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology*, n. 37, p. 43-51, 1987.

SELDIN, L. 'Bacillus' fixadores de nitrogênio e seus bacteriófagos. Tese (mestrado). Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro: 1982.

UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H.; DAZZO, F. B. Association of 'Azospirillum' with grass roots. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 39, p. 219. Nova York: 1980.