

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E SEROLÓGICA
DE DIAZOTRÓFICOS ASSOCIADOS A GRAMÍNEAS**

IVANILDO EVÓDIO MARRIEL

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof^a Dr^a **ELKE J.B.N. CARDOSO**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Marriel, Ivanildo Evódio

Diversidade morfológica, bioquímica e serológica de diazotróficos associados a gramíneas / Ivanildo Evódio Marriel. - - Piracicaba, 1996.

103 p. : il.

Tese (doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.

Bibliografia.

1. Bactéria 2. Gramínea 3. Fixação de nitrogênio 4. Inoculação 5. Milho I.
Título.

CDD 589²
631.41

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E SEROLÓGICA DE
DIAZOTRÓFICOS ASSOCIADOS A GRAMÍNEAS**

IVANILDO EVÓDIO MARRIEL

Aprovada em 16.04.1997

Comissão julgadora:

Prof^a Dr^a Elke J.B.N. Cardoso

ESALQ/USP

Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais

ESALQ/USP

Prof^a Dr^a Siu Mui Tsai

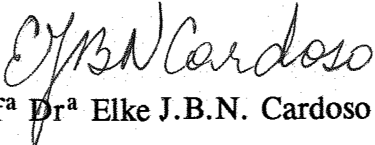
CENA/USP

Dr. Helvécio De-Polli

CNPAB/EMBRAPA

Prof. Dr. Pedro Magalhães Lacava

IQ/UNESP


Prof^a Dr^a Elke J.B.N. Cardoso
Orientador

A DEUS

Pela luz

OFEREÇO

À minha esposa Sara

Aos meus filhos, João Paulo

Mariana e Pedro Henrique

À minha mãe Estelina (*in memoriam*)

Ao meu pai Veredino

Aos meus irmãos, cunhados e sogros

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a. Elke J.B.N. Cardoso, pela orientação, amizade, incentivo e sobretudo pelo imensurável apoio e compreensão para a realização deste trabalho.

Aos Docentes da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em geral, pelas valiosas informações e formação acadêmica. Em especial, aos Professores Geraldo Victorino de França e Márcio Lambais, pelo apoio e ajuda.

Aos Mestres, em geral, que, desde os primeiros passos contribuíram para a caminhada na trilha da informação científica.

Ao Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”(ESALQ/USP), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e Embrapa Milho e Sorgo pela oportunidade oferecida para a realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro.

Aos amigos da Embrapa Milho e Sorgo pela solidariedade, em particular, ao Antônio Carlos de Oliveira e Fernando Tavares Fernandes, pela ajuda.

Aos Departamentos de Economia Rural, Área de Nutrição Humana e Alimentos e de Zootecnia Não Ruminantes da ESALQ/USP, pela manutenção das cobaias utilizadas no estudo.

Aos colegas e amigos de curso Antônio Saraiva, Luiza Nakayama, Maria do Rosário, Rosana Vieira, Júlio Filho, Heron Costa, Willian Natale e Gaspar Gonsález, pela amizade e convívio.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Solo (ESALQ/USP), Luis Fernando Baldessin e Denise L.C. Mescolotti, pela convivência amiga e pela colaboração.

As bolsistas Roberta, Elizabete, Conceição e Nádia, pela valiosa contribuição.

Aos Funcionários da Biblioteca Central da ESALQ/USP, em especial, a Kátia Maria de Andrade Ferraz, pela presteza e colaboração na correção das citações bibliográficas.

Aos Funcionários do Setor de Informação e Documentação da Embrapa Milho e Sorgo, pela obtenção das referências bibliográficas.

À amiga Clotilde Maria Batochio Cunha, pela datilografia e elaboração do texto.

À minha esposa, Sara, que, com amor e espírito de doação, permitiu superar os momentos difíceis e enriquecer as horas alegres.

A João Paulo, Mariana e Pedro Henrique, nossos filhos, razão de todo o esforço.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Associação <i>Azospirillum</i> spp. - planta hospedeira.....	8
2.2. Inoculação de cereais com <i>Azospirillum</i> spp.....	13
2.3. Especificidade <i>Azospirillum</i> spp. - cereais.....	16
2.4. Caracterização serológica de <i>Azospirillum</i> spp.....	18
2.4.1. Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA.....	21
2.4.2. Dot-immunobinding assay - DIBA.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Isolamento e identificação de bactérias diazotróficas.....	26
3.2. Caracterização serológica de diazotróficos.....	27
3.2.1. Preparação de imunógenos e imunização.....	28
3.2.2. Determinação do título de anticorpos.....	29
3.2.3. Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA.....	30
3.2.4. Dot immunobinding assay - DIBA.....	31
3.3. Ocorrência natural de endófitos diazotróficos de milho e sorgo	32

	viii
3.4. Caracterização bioquímica de isolados de diazotróficos.....	32
3.5. Respostas de genótipos de milho à inoculação com <i>Azospirillum ssp.</i>	33
3.5.1. Efeito da inoculação com <i>Azospirillum ssp.</i> sobre a mor- fologia do sistema radicular, crescimento e acúmulo de nutrientes em milho.....	33
3.5.2. Efeito da inoculação com <i>Azospirillum ssp.</i> sobre a atividade da redutase do nitrato.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Isolamento e identificação de bactérias diazotróficas	37
4.2. Caracterização serológica de isolados de diazotróficos.....	45
4.3. Ocorrência natural de endófitos em milho.....	52
4.4. Caracterização bioquímica de isolados de diazotróficos	55
4.5. Respostas de genótipos de milho à inoculação com <i>Azospirillum ssp.</i>	58
4.5.1. Efeitos da inoculação com <i>Azospirillum ssp.</i> sobre a mor- fologia do sistema radicular, crescimento e acréscimo de nutrientes em milho.....	58
4.5.2. Efeitos da inoculação com <i>Azospirillum.ssp.</i> sobre a atividade da redutase em milho.....	74
5. CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICES.....	98

LISTA DE TABELAS

- 1 - Ocorrência de diferentes espécies de *Azospirillum* em algumas das amostras analisadas.
..... 40
- 2 - Identificação numérica de bactérias diazotróficas, isoladas de origens diversas, agrupadas serologicamente através do teste ELISA.
..... 46
- 3 - Limite de detecção de *Azospirillum* spp. em suspensão de células e especificidade dos antissoros, determinados em reações cruzadas entre os diferentes antígenos (Ag) e antissoros (As) através do teste ELISA.
..... 50
- 4 - Valores de pH e teores de alguns macro e micronutrientes em seiva de 12 genótipos de milho, cultivados no campo sem inoculação artificial, no estágio de florescimento
..... 57
- 5 - Diferenciação bioquímica de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas, através do kit API 20E.
..... 59
- 6 - Acúmulo de matéria seca (g/planta) na parte aérea e nas raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 61

- 7 - Teores médios de macronutrientes (g kg^{-1}) na parte aérea de genótipos milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 62
- 8 - Conteúdos médios de macronutrientes (mg /planta) na parte aérea de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 63
- 9 - Teores médios de micronutrientes ($\mu\text{g g}^{-1}$) na parte aérea de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 64
- 10 - Conteúdos médios de micronutrientes ($\mu\text{g/planta}$) na parte aérea de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 65
- 11 - Teores médios de macronutrientes (g kg^{-1}) em raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 67

- 12 - Conteúdos médios de macronutrientes (mg/planta) em raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 68
- 13 - Teores médios de macronutrientes (g kg⁻¹) em raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 69
- 14 - Conteúdos médios de micronutrientes (µg / planta) em raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.
..... 70
- 15 - Somas parciais e total de intersecções de raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Média de três repetições.
..... 71
- 16 - Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculadas ou não com uma mistura de estirpes homólogas de *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a emergência. Médias de três repetições.
..... 76

LISTA DE FIGURAS

- 1 - Heterogeneidade morfológica de colônias de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas.
..... 41
- 2 - Heterogeneidade morfológica de colônias de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas.
..... 42
- 3 - Heterogeneidade morfológica de colônias de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas.
..... 43
- 4 - Heterogeneidade morfológica de colônias de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas.
..... 44
- 5 - Classificação serológica de 157 isolados de bactérias diazotróficas obtidos de origens diversas, através do teste ELISA.
..... 47
- 6 - Limite de detecção de *Azospirillum* spp. em suspensão de células e especificidade dos antissoros, determinados em reações cruzadas entre os diferentes antígenos (Ag) e antissoros (As), através do teste DIBA.
..... 51

- 7 - Ocorrência natural seletiva dos serogrupos *A. lipoferum* (59b) e *A. brasilense* (Sp7) em amostra de seiva de 28 genótipos de milho, cultivados no campo sem inoculação artificial, no estágio de florescimento, determinada através do teste DIBA.
..... 54
- 8 - Ocorrência natural dos serogrupos *A. lipoferum* e *A. brasilense* em amostra de seiva de 63 genótipos de milho e 10 de sorgo, cultivados no campo sem inoculação artificial, no estágio de florescimento, determinada através do teste ELISA.
..... 56
- 9 - Comparação do sistema radicular do genótipo de milho CMS 51 em solução nutritiva, inoculado e não inoculado com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação.
..... 73

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E SEROLÓGICA
DE DIAZOTRÓFICOS ASSOCIADOS A GRAMÍNEAS**

Autor: IVANILDO EVÓDIO MARRIEL

Orientador: Prof^a Dr^a ELKE J.B.N. CARDOSO

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio constitui uma tecnologia viável para o *input* de N na agricultura, visando sistemas agrícolas sustentáveis. Em gramíneas, a exploração do potencial das associações entre macro e microsimbionte depende, principalmente, na maioria dos casos, da identificação dos diazotróficos envolvidos. Neste trabalho, procurou-se: isolar, identificar e caracterizar serológica e bioquimicamente diazotróficos associados com estas culturas, com ênfase em milho e sorgo; avaliar as respostas de diferentes genótipos de milho cultivados em solução nutritiva à inoculação com *Azospirillum* spp. homólogos. A partir de amostras de solo, raízes de diferentes espécies de plantas, e seiva, estigma, grãos imaturos de milho foram obtidos e selecionados diferentes diazotróficos. Os resultados mostraram ampla distribuição das espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* nas amostras analisadas dentre as bactérias identificadas, independentemente da planta hospedeira. Entretanto, encontrou-se grande número de isolados que não se enquadraram nestas espécies de acordo com as

características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas utilizadas como parâmetros de identificação. A caracterização serológica efetuada com os soros policlonais específicos obtidos contra as espécies de *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*, resultou em 6 serogrupos distintos entre os 157 isolados testados, utilizando-se das técnicas de ELISA. As técnicas ELISA e DIBA foram igualmente sensíveis para a diferenciação das espécies de *Azospirillum* em cultura pura. Mas, para a detecção de endofíticos em seiva de plantas, o teste DIBA mostrou-se aparentemente superior. Encontrou-se predominância quase absoluta de endófitos naturais antígenicamente próximos de *A. lipoferum* em seiva de milho e de sorgo, sugerindo ser esta espécie importante nestas plantas e indicando uma elevada especificidade nas interações bactéria-cereais. A caracterização bioquímica, através do kit API 20E confirmou a grande variabilidade entre os isolados. A inoculação com *Azospirillum* spp. homólogos estimulou a atividade da redutase do nitrato em folhas de milho, bem como, resultou em maior eficiência na absorção e acúmulo da matéria dos macro nutrientes, especialmente N, e dos micronutrientes na parte aérea de milho, sendo esses efeitos dependentes do genótipo da planta. Os resultados mostram a possibilidade de se selecionar genótipos de milho superiores para fixação biológica de N₂.

**MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND SEROLOGICAL DIVERSITY
OF DIAZOTROPHS ASSOCIATED TO GRAMINEAE**

Author: IVANILDO EVÓDIO MARRIEL

Adviser: Prof^º. Dr^ª. ELKE J.B.N. CARDOSO

SUMMARY

Biological nitrogen fixation has become a viable technology for N input in sustainable agricultural systems. In grasses, among other factors, the optimization of these associations depend, mainly, on the identification of the main diazotroph involved in these interactions. The objective of this work was to isolate, identify and characterize, morphologically, serologically and biochemically, diazotrophs associated with these gramineae crops, with emphasis on corn and sorghum. Also, to evaluate the responses to the inoculation with *Azospirillum* spp. of different corn genotypes cultivated in nutrient solution. From soil samples, roots of different plant species, phloem sap, stigma, immature corn grains different diazotrophs were isolated. The results showed wide distribution of *A. lipoferum* and *A. brasilense* species among the identified bacteria, independent of the host plant. Notwithstanding, great number of isolates different from these species were found based on morphological, physiological and biochemical characteristics. The serological characterization by ELISA, with specific

policlonal antibodies raised against *A. lipoferum*, *A. brasilense* and *A. amazonense*, resulted in 6 distinct serogroups among the 157 isolates tested. Both serological techniques were equally sensitive for the differentiation of *Azospirillum* species in pure culture. However, for the detection of endophytes in plant phlem sap, the DIBA test was more suitable. A nearly absolute dominance of natural endophytes antigenically related to *A. lipoferum* was observed in corn and sorghum phloem sap, suggesting that this is the main species established in these plants, and a high degree of specificity. The biochemical characterization, using the kit API 20E, confirmed a great variability between the isolates. The inoculation of corn with *Azospirillum* homologues stimulated the activity of the nitrate reductase in leaves, and resulted in a higher efficiency of absorption and accumulation of macro and micronutrients in shoots, except calcium and manganese. Nutritional effects were dependent of the plant's genotype. The results indicate the possibility for selection of maize genotypes more efficient in biological N₂ fixation.

1. INTRODUÇÃO

A população humana no globo tem apresentado uma taxa de crescimento anual em torno de 2% (FAO, 1992), o que implica necessariamente em um aumento na produção de alimentos. Uma maior disponibilidade de alimentos pode ser alcançada através do ganho nos índices de produtividade das culturas ou da expansão das fronteiras agrícolas, com a incorporação de novas áreas ao sistema produtivo. Entretanto, nos países com baixo índice de terras agricultáveis ociosas, o aumento de produção por unidade de área representa a única alternativa para o fornecimento adequado de alimentos.

Somente para ser mantida nos níveis atuais, a produtividade agrícola depende do reabastecimento das reservas de nutrientes que são removidos ou perdidos do sistema solo-planta. No caso do nitrogênio, o seu *input* nos sistemas agrícolas pode ser na forma de fertilizantes nitrogenados ou via fixação biológica de N₂ atmosférico.

Na agricultura moderna, a adubação com nitrogênio mineral destaca-se entre as práticas utilizadas para o incremento de produtividade das culturas. O aumento de duas vezes da produção global de cereais ocorrido entre as décadas de 60 e 90 tem sido atribuído, em parte, ao aumento de 7 vezes no consumo de fertilizantes nitrogenados no mesmo período (Peoples et al., 1995).

Entretanto, o uso de fertilizantes nitrogenados nos diferentes sistemas agrícolas depende, em última análise, de considerações econômicas e da presença efetiva de infraestrutura para produção e distribuição de fertilizantes. Esses fatos, conjugados com a baixa eficiência de utilização de N derivado de fertilizantes pelas plantas, raramente acima de 50% (Oliveira et al., 1994), e a maior conscientização dos custos ambientais do N perdido de fertilizantes, têm sido considerados por alguns pesquisadores como fator inibidor no uso desses insumos em determinadas estruturas sócio-econômicas.

Embora altamente eficientes para a maximização de rendimentos físicos, os modelos agrícolas que apresentam elevada dependência de recursos externos à propriedade têm sido questionados quanto à sua sustentabilidade a longo prazo. Mesmo porque, os impactos negativos de tais sistemas sobre o ecossistema raramente têm sido debitados contra os ganhos em produtividade (Tangley, 1986).

Nos dias atuais, a necessidade de se desenvolver sistemas agrícolas sustentáveis vem se transformando em foco de grande impacto para a agricultura mundial. Gradativamente aumenta a conscientização, não só da comunidade científica como, principalmente, da população em geral, preocupada com as conseqüências de uma agricultura intensiva que, invariavelmente, provoca degradação da qualidade do solo, do ar e da água. A amplitude dessa preocupação é sintetizada na frase atribuída a Suzuki (1990) "We no longer inherit the Earth from our parents, we borrow it from our children".

Por outro lado, a fixação biológica de N₂, utilizando fontes renováveis de energia, desempenha papel importante para a agricultura, reduzindo riscos do sistema

produtivo e conservando a base de recursos agrícolas da propriedade. A contribuição deste processo para a ciclagem de nitrogênio pode prover a sustentabilidade em N para os mais variados ecossistemas do globo, sem os custos econômicos e ambientais da adubação química.

Entre os sistemas biológicos capazes de aproveitar o nitrogênio diretamente da atmosfera, a simbiose leguminosas-rizóbio é o mais especializado, respondendo por 22% de todo N incorporado ao ecossistema terrestre (Peoples et al., 1995).

O grande desafio da pesquisa no momento é a extensão destes processos biológicos para outras plantas, incluindo as gramíneas, especialmente, as de importância sócio-econômica. Em termos globais, os cereais constituem a base alimentar mais importante para a população humana e ocupam em torno de 50% das terras cultivadas. Somente as culturas de trigo, arroz e milho consumiram 53% do total de fertilizantes utilizados no ano de 1991 (Peoples et. al., 1995). Esses dados justificam a grande euforia observada no meio científico com a descoberta, nos últimos anos, de que gramíneas também podem se beneficiar de quantidades economicamente significativas de N através da fixação biológica.

Esta nova área de pesquisa tem despertado particular interesse para países em desenvolvimento, cuja agricultura requer uma minimização de investimentos para permanecer como uma atividade sustentável e, especialmente, em regiões tropicais, onde há melhores perspectivas de uma agricultura economicamente viável basear-se em nitrogênio fixado biologicamente. Dada a extensa área ocupada pelos cereais,

aproximadamente 5 vezes maior que das leguminosas, a fixação biológica associada a estas culturas torna de extrema importância, mesmo que apenas parte de suas necessidades em N pudesse ser fornecida por este processo.

Para se desenvolver práticas agronomicamente viáveis ao aproveitamento desta fonte de N, resta, ainda, conhecer e definir mais claramente fatores que intervêm no processo, os mecanismos biológico e bioquímico da associação, bem como identificar o microrganismo principal responsável pelo sistema fixador efetivo nas interações com diferentes espécies de plantas. Pela sua extrema habilidade discriminatória, o uso de marcadores imunológicos pode contribuir para a determinação da importância de cada tipo de bactéria envolvida nestas interações e para a seleção de estirpes visando estudos de inoculação.

Os objetivos deste trabalho foram isolar, identificar e caracterizar morfológica, serológica e bioquimicamente isolados de diazotróficos associados a gramíneas e quantificar alterações morfológicas de raízes, crescimento e incorporação de nutrientes em plantas de milho que foram inoculadas com diazotróficos homólogos e cultivadas em solução nutritiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O desenvolvimento e a adoção de sistemas de manejo agrícolas sustentáveis têm recebido grande ênfase internacional, nos dias atuais (Papendick & Parr, 1992; Harwood, 1990).

Embora, com uma conceituação ainda complexa, uma agricultura sustentável envolve, como ponto básico, o manejo adequado dos recursos agrícolas de modo a satisfazer as necessidades humanas, enquanto mantém ou mesmo melhora a qualidade ambiental e conserva os recursos naturais (Harwood, 1990). Dentro deste ponto de vista, a sustentabilidade dos ecossistemas deve ser avaliada, levando-se em consideração também o relacionamento entre produtividade, diversidade biológica e qualidade do solo (Kennedy & Smith, 1995). Esses autores comentam, ainda, que os programas de diversidade biológica tem negligenciado os microrganismos do solo, visto que, somente 13% dos microrganismos da Terra estão identificados e, conseqüentemente, uma vasta parcela da biota permanece desconhecida e não estudada.

Em geral, a capacidade de suprimento de N dos solos declina rapidamente com o incremento da atividade agrícola e o N derivado da mineralização da matéria orgânica tem de ser suplementado com outras fontes (Herridge et al., 1994). Com a ênfase internacional sobre o desenvolvimento sustentável ambientalmente, têm-se

renovado as atenções sobre o potencial das diferentes associações biológicas como fonte de N para a agricultura

Após 100 anos da descoberta da existência do processo de fixação biológica de N_2 (FBN) associado com leguminosas, observa-se grande progresso no entendimento da base molecular da interação entre macro e microssimbionte, além do observado no aspecto prático. Este processo, que utiliza fonte de energia renovável e conserva a base de recursos da propriedade, tornou-se uma tecnologia importante do ponto de vista sócio-econômico e ecológico. Estima-se que a contribuição da fixação biológica supera 170 milhões de toneladas de nitrogênio fixado para a biosfera (Earl & Austubel, 1983), sendo que somente a simbiose rizóbio-leguminosas respondem por 22% deste total (Peoples et al., 1995).

Döbereiner & Duque (1980) comentam que o grande desafio da pesquisa atual é a extensão deste fenômeno biológico para as plantas não leguminosas e que esforços de pesquisa consideráveis têm sido dedicado a esta área. Vários grupos de pesquisadores têm começado a explorar esta possibilidade através da indução de estruturas como nódulos, denominados de para-nódulos ou pseudo-nódulos, especialmente em cereais, embora os conhecimentos da base bioquímica e molecular destas interações planta-microrganismos, fisiologia da assimilação de nitrogênio e fixação de N_2 sejam ainda incipientes.

Neste sentido, De Bruijn et al. (1995) apresentam uma revisão sobre o estado da arte no assunto e comentam os aspectos potenciais e limitações dessa nova

associação entre bactérias fixadoras e gramíneas. Dentre as várias tentativas de se obter sistemas fixadores efetivos em cereais, têm-se utilizado tratamento químico (Tchan et al., 1991), tratamentos enzimáticos (Al-Mallah et al., 1989) microrganismos mutados ou transformados por engenharia genética (Rolf & Bender, 1990) para a indução de pseudo-nódulos.

A infecção dessas estruturas por rizóbios ou diazotróficos de vida livre tem sido sugerido como veículo potencial pra que os cereais fixem seu próprio nitrogênio. Entretanto, até o momento, somente a inoculação de plantas de trigo com *Azospirillum* tratadas com 2-4D mostraram pseudo-nódulos com atividade da nitrogenase (Tchan et al. 1991).

Não obstante a existência de alguns resultados animadores nesta área, salienta-se que a concentração de esforços em sistemas naturais pode, a curto prazo, ser mais interessante, haja visto que nestes sistemas, diazotróficos endofíticos podem contribuir de modo significativo para o crescimento da planta hospedeira via fixação biológica, à semelhança do que tem sido descrito para a cana-de-açúcar e alguns cereais (Döbereiner et al., 1993; Boddey et al., 1995). Sugere-se, ainda, que parece suficiente identificar endofíticos estáveis na cultura de interesse e, se necessário, transformá-los geneticamente para fixar N_2 eficientemente e excretá-lo para o uso da planta.

Do lado do hospedeiro, a maximização da eficiência da fixação associativa pode ser perseguida através do melhoramento da planta, visando maior eficiência na associação com a bactéria fixadora de N_2 . Neste caso, os trabalhos deveriam ser conduzidos sob condições de baixo N no solo para permitir a expressão

do potencial de fixação e a discriminação de genótipos superiores e inferiores em relação a esta característica (Bliss, 1993)

2.1. Associação *Azospirillum* spp. - planta hospedeira

Os relatos iniciais e esporádicos sobre FBN associada com gramíneas tropicais só despertaram interesse, de fato, após a introdução do método de redução de acetileno, que permitiu estimativas mais precisas da atividade da nitrogenase “in situ” (Hardy et al., 1968). A medida da redução de acetileno surgiu a partir de observações de que a enzima fixadora de nitrogênio, a nitrogenase catalizava também a redução de acetileno (C_2H_2) para etileno (C_2H_4). Em razão da simplicidade, rapidez e sensibilidade na quantificação de etileno por cromatografia gasosa, este método desempenhou papel importante na pesquisa sobre FBN. Utilizando-se desta técnica, demonstrou-se fixação não-simbiótica em diferentes culturas como o arroz (Balandreau et al., 1976; Yoshida & Ancajas, 1973), milho (Balandreau et al., 1974; Bülow & Döbereiner, 1975; Dommergues et al., 1973) e algumas gramíneas forrageiras (Döbereiner et al., 1976). Esses resultados indicaram a importância da FBN em raízes de plantas não-leguminosas. Mas, somente mais tarde, através de outras metodologias, como balanço de N, incorporação de $^{15}N_2$ e diluição isotópica de ^{15}N , foi possível comprovar que, embora variáveis, quantidades economicamente importantes de N para a nutrição de arroz (Watanabe et al., 1987), sorgo (Giller et al., 1984), gramíneas forrageiras (De-Polli et

al., 1977; Boddey & Vitoria, 1986) e cana-de-açúcar (Lima et al., 1987), podiam ser derivadas do N₂.

Entretanto, para se explorar estas associações naturais ou mesmo aumentá-las, os diazotróficos responsáveis tem de ser isolados e identificados e os mecanismos de suas interações com plantas melhor compreendidos (Döbereiner, 1989).

A partir das observações pioneiras de Döbereiner & Day (1976) de que o uso de meios semi-sólidos era a condição ideal para o crescimento de diazotróficos dependentes de fixação biológica do nitrogênio da atmosfera, esta metodologia tem sido empregada extensivamente no isolamento e caracterização de microrganismos fixadores de diferentes plantas e de diferentes condições edafoclimáticas (Döbereiner et al., 1976), indicando que tais diazotróficos ocupam, preferencialmente, sítios onde a concentração de oxigênio seja limitada. Esta descoberta revolucionou e ampliou as pesquisas sobre todos os aspectos da fixação biológica nas associações entre diazotróficos e não-leguminosas, denominadas mais comumente de interação associativa ou fixação de N₂ associativa.

Döbereiner et al. (1993) e Döbereiner & Pedrosa (1987) discutem detalhadamente os vários tipos destas interações, bem como, as diferentes bactérias fixadoras de N₂ envolvidas já identificadas e classificadas nos diversos gêneros, incluindo *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter* e outros.

Entre os microrganismos diazotróficos encontrados em associações com cereais e gramíneas, as espécies de *Azospirillum* constituem o grupo mais bem estudado, sendo numerosos os estudos sobre ecologia, fisiologia da associação com raízes, análise e manipulação genética (Bashan & Levanony, 1990; Döbereiner & Pedrosa, 1987; Döbereiner, et al., 1992). Assim, *Azospirillum* tornou-se um organismo modelo para estudos de interações planta-diazotróficos (Michiels et al., 1989).

As bactérias do gênero *Azospirillum* foram isoladas a partir de raízes de *Digitaria* e classificadas inicialmente como *Spirillum lipoferum* (Döbereiner & Day, 1974), Mais tarde, foi, então, proposto o gênero *Azospirillum* com duas espécies: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978), com base em diferenças morfológicas, fisiológicas e, em seguida, homologia de DNA. Atualmente, outras espécies já foram descritas: *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983), isolada de gramíneas da Amazonia, *A. halopraeferans* (Reinhold et al., 1987), isolada de gramíneas do Paquistão e tolerantes a sais, e *A. irakense* (Khammas et al., 1989), isolada de plantas de arroz no Iraque.

A maioria das estirpes fixadoras de N₂, isoladas de gramíneas tropicais, exceto de cana-de-açúcar são referidas como *A. lipoferum* ou *A. brasilense* (Krieg & Döbereiner, 1984). Essas espécies se diferenciam pela habilidade de crescer em glicose e pelo seu requerimento de biotina. Enquanto, *A. lipoferum* requer biotina e fixa N₂ em meio com glicose como fonte de carbono, *A. brasilense* não metaboliza glicose e cresce na ausência de biotina (Döbereiner, 1993).

Azospirillum spp. caracterizam-se como bactérias geralmente gram-negativas, tipo bastonetes, bastante móveis, com 0.8 a 01 μm de diâmetro, 2 a 4 μm de comprimento, com grânulos intracelulares de poli-hidroxibutirato. São aeróbios típicos, quando supridos com fonte de N-combinado, e microaerofílicos quando dependem de FBN (Krieg & Döbereiner, 1986). Em meio semi-sólido formam uma película delgada ou balão abaixo da superfície do meio, onde a concentração de oxigênio permite a fixação de nitrogênio para iniciar o seu crescimento (Okon, 1985). Com a continuação do crescimento e maior exigência de oxigênio, há o movimento da película em direção à superfície, onde se torna densa.

A associação entre as bactérias deste gênero e raízes das plantas depende de uma interação mútua e íntima entre o macro e o microssimbionte. Embora sem uma demonstração inequívoca da sua contribuição no processo de fixação biológica, o estabelecimento de *Azospirillum*, inoculado ou não, em cereais, está bem documentado (Baldani et al., 1987; Döbereiner & Pedrosa, 1987; Boddey et al., 1995).

Considera-se que este processo se inicia com a colonização do sistema radicular do hospedeiro, onde provavelmente as bactérias alcançam os sítios de infecção através de quimiotaxia e/ou aerotaxia (Barak et al., 1983; Okon, 1984). Estudos estruturais em raízes de milheto e de microscopia ótica em milho, trigo e sorgo (Magalhães et al., 1979 ; Patriquin & Döbereiner, 1978; Patriquin et al., 1983) sugerem que a invasão das raízes deve ocorrer longitudinalmente, a partir da infecção pelos pontos de emergência das raízes laterais até atingir as raízes principais. A colonização

ocorre nos espaços inter e intracelulares dos tecidos cortical, parenquimatoso e xilema.

O estabelecimento de *Azospirillum* nos espaços intracelulares do xilema tem sido atribuído à presença de ácido málico, importante constituinte da seiva de milho (Butz & Long, 1979), e à marcante preferência destas bactérias por ácidos orgânicos (Tarrand et al., 1978). O ácido málico é a fonte de carbono para crescimento ótimo de *Azospirillum* em meio de cultura (Döbereiner, 1980). Deste modo, o xilema tem sido considerado por Döbereiner (1983) como principal sítio de fixação biológica na associação milho-*Azospirillum* em razão não só da disponibilidade de ácidos orgânicos, como também da existência de baixa pressão parcial de oxigênio nesse local, condição essencial para a atividade da nitrogenase.

Magalhães et al. (1979) estimaram a população de *Azospirillum* durante o ciclo vegetativo do milho cultivado no campo. Nas avaliações, encontraram maior número de bactérias, 10^7 a 10^8 células por grama de raízes esterilizadas, no período reprodutivo, coincidindo com a época de atividade da nitrogenase mais elevada. Esses dados indicam que a fixação de nitrogênio ocorre principalmente no interior das raízes.

Michiels et al. (1989) enumeram algumas propriedades para a capacidade competitiva destas bactérias na rizosfera: a) *Azospirillum* são atraídas quimiostaticamente para a rizosfera pelos exsudatos das raízes e apresentam metabolismo altamente versátil, o que lhes permite sobreviver sob condições adversas no solo; b) podem aderir à superfície das células radiculares com rapidez; c) alguns isolados podem penetrar nas

raízes e colonizar espaços inter e intra-celulares; d) várias estirpes de *Azospirillum* produzem substâncias bactericidas, inibidores de outros microrganismos na rizosfera, e sideróforos, que possibilitam uma aquisição eficiente de ferro; e) podem diferenciar-se em cistos e sobreviver melhor sob condições de estresses ambientais.

2.2. Inoculação de cereais e gramíneas com *Azospirillum*

Em sequência à identificação dos primeiros isolados de *Azospirillum*, houve grande interesse em testar o efeitos de tais bactérias em plantas cultivadas no campo e em condições controladas. Boddey & Döbereiner (1988) citam que nos anos seguintes a redescoberta de *Azospirillum* foram conduzidos em torno de 100 ensaios sobre inoculação em gramíneas, incluindo cereais. A inoculação com esta bactéria tem se mostrado efetiva em aumentar a atividade da nitrogenase e proporcionar ganhos, principalmente, no acúmulo de matéria seca, produção de grãos e concentração de nitrogênio e outras características agronômicas na maioria dos estudos.

Okon (1985) apresentou resultados de um levantamento sobre sucesso de inoculação com *Azospirillum* e concluiu que em 65% dos casos houve respostas significativas sobre produção de matéria seca e/ou produção de gramíneas. Em geral, o efeito da inoculação com *Azospirillum* sobre produção situa-se em torno de 10 a 30%, e em alguns casos, valores mais elevados de 50 a 250%, em relação ao controle não-inoculado, têm sido mencionados (Bashan & Levanony, 1990).

Em relação à cultura de milho, após o trabalho de Bülow & Döbereiner (1975) mostrando significativa fixação de N_2 , com base na atividade da nitrogenase, em plantas cultivadas no campo sem inoculação, vários estudos têm sido conduzidos com esta cultura visando avaliar o efeito da inoculação, sendo encontrados alguns com efeitos positivos (Magalhães et al., 1979; Cohen et al., 1980; Freitas et al., 1982, Hegazi et al., 1983; Kapulnik et al., 1982) e outros sem efeito (Albrecht et al., 1977). Em Israel, onde os solos possuem baixa ou nenhuma população nativa de *Azospirillum*, as respostas à inoculação são mais consistentes, e a recomendação desta prática já apresenta aspectos comerciais (Okon, 1985).

De acordo com Bashan & Levanony (1990) aumentos moderados, em torno 20%, atribuídos à inoculação com diazotróficos seriam considerados comercialmente significativos na agricultura moderna. Os autores consideram ainda que uma das variáveis básicas que contribuem para a complexidade das respostas à inoculação é a interação dos genótipos da planta e da bactéria. O efeito do genótipo da planta sobre a fixação associativa tem sido amplamente demonstrado em cereais, incluindo o milho e sorgo (Bülow & Döbereiner, 1975; Bülow, 1978; Holl, 1983).

Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação tem sido atribuída ao uso de estirpes inadequadas (Döbereiner & Duque, 1980), pois foi desconsiderada certa compatibilidade que pode existir entre a bactéria e a planta hospedeira. Baldani & Döbereiner (1980) testaram diferentes estirpes inoculadas em trigo de origens diversas e concluíram que estirpes homólogas tendem a ser mais eficientes do que as

isoladas de plantas de outras espécies. O trabalho de Baldani et al. (1983) também apresenta respostas positivas com plantas de trigo inoculadas com bactérias isoladas da própria cultura e ausência de respostas quando se utilizaram estirpes isoladas de milho.

Como bactérias diazotóficas, acreditava-se que a fixação de N_2 na rizosfera ou dentro da raiz, e liberação de parte do nitrogênio fixado para a planta constituísse o principal modo de ação de *Azospirillum* no hospedeiro. Entretanto, entre os efeitos estimuladores de crescimento de plantas, este processo parece não ocorrer em vários estudos, onde se observaram respostas positivas à inoculação com tais bactérias (Boddey & Döbereiner, 1988).

Algumas estirpes de *Azospirillum* produzem hormônios de crescimento em cultura pura (Bottini et al., 1989; Tien et al., 1979) e sabe-se que essas substâncias alteram a morfologia do sistema radicular, aumentam a densidade de raízes e interferindo no crescimento das plantas inoculadas. Boddey et al. (1986) utilizaram o método de diluição isotópica de ^{15}N para estimar a contribuição da fixação em plantas de trigo cultivadas em vasos. O aumento de N nos grãos foi atribuída ao maior aproveitamento do N do solo e do fertilizante.

Diferentes mecanismos alternativos para os efeitos da inoculação têm sido propostos: a) efeitos hormonais que alteram o metabolismo e o crescimento da planta, visto que *Azospirillum* ssp. produzem diferentes hormônios de crescimento em cultura pura (Bottini et al., 1989; Crossier et al., 1988; Fallik et al., 1989; Horemans et al.,

1986; Tien et al., 1979); b) aumento do sistema radicular, possivelmente relacionado à alteração no balanço hormonal da planta, resultando em maior absorção de nutrientes e água e, em consequência, maior acúmulo de matéria seca (Okon, 1985; Okon & Kapulnik, 1986; Sarig et al., 1988; Lin et al., 1983); c) atividade de redutase do nitrato da bactéria na raiz, aumentando o acúmulo de nitrato em plantas inoculadas (Boddey et al., 1986; Ferreira et al., 1987); d) redução da taxa de respiração e aumento da atividade de enzimas relacionadas ao ciclo de Krebs (Hadas & Okon, 1987).

Não existem dados quantitativos de cada um destes mecanismos, entretanto, a hipótese mais provável é a participação simultânea ou sucessão de diferentes mecanismos na interação planta-bactéria. De acordo com esta hipótese, talvez, *Azospirillum* seja melhor definido como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (RPCP) (Bashan & Levanony, 1990).

2.3. Especificidade *Azospirillum* spp. - planta hospedeira

Nas associações simbióticas entre rizóbio e leguminosas há uma extensa lista de publicações demonstrando os mecanismos que governam a especificidade entre os macro e microssimbiontes. Em geral, estão envolvidos metabólitos produzidos pelas plantas que agem como sinais para o início do processo da nodulação e fixação de N_2 .

No processo de fixação biológica associativa com *Azospirillum*, por outro lado, a ocorrência de tais mecanismos ainda é uma questão controversa. Mas, uma

série de resultados disponíveis na literatura indica a existência de certo grau de especificidade entre *Azospirillum* e seus hospedeiros.

A primeira evidência experimental sobre especificidade hospedeira na associação com gramíneas foi descrita por Baldani & Döbereiner (1980). Quando as bactérias foram isoladas de raízes lavadas de milho, trigo ou arroz, cultivados em vasos ou no campo, não houve predominância consistente de nenhuma das espécies de *Azospirillum* testadas. Por outro lado, quando as raízes foram desinfestadas superficialmente com cloramina T, encontrou-se predominância de *A. lipoferum* entre os isolados obtidos de milho e de *A. brasilense* entre os de arroz e de trigo. Em ensaios posteriores, sob condições de campo, utilizando-se esta técnica de desinfestação, os trabalhos mostraram que, em geral, em plantas C₄ predominavam isolados de *A. lipoferum* e nas gramíneas C₃ predominavam *A. brasilense* (Baldani et al., 1987); Döbereiner & De-Polli, 1980). Resultados similares foram obtidos em zonas temperadas (Haahtela et al., 1981; Lamm & Neyra, 1981). Em contraste, essa especificidade não foi observada em outros estudos (Bashan & Levanony, 1990; Okon & Kapulnik, 1986), onde a inoculação com uma única estirpe afetou positivamente diferentes espécies de plantas.

Barak et al. (1983) e Reinhold et al. (1985) demonstraram que células de *Azospirillum* respondem positivamente a quimiotrativos como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos e, portanto, esses compostos desempenham papel importante na colonização do sistema radicular das plantas. Como a composição dos exsudatos varia com o

genótipo da planta, pode-se especular o envolvimento de algum composto no estabelecimento preferencial de determinada espécie de bactéria em uma planta hospedeira.

Por outro lado, em alguns casos, a falta de especificidade pode ser explicada pela baixa densidade de *Azospirillum* nativo nos solos utilizados para competir com as estirpes inoculadas (Boddey & Döbereiner, 1988). Bashan & Levanony (1990) enfatizam a importância da seleção de estirpes como ponto crucial na determinação da especificidade e consideram que grande número de estirpes tem de ser isoladas a partir de diferentes origens, caracterizadas e testadas sob diferentes condições ambientais para cada espécie de planta.

2.4. Caracterização serológica de *Azospirillum* spp.

Considera-se como pré-requisito importante para se obter uma resposta eficiente da inoculação com estirpes de bactérias diazotróficas, selecionadas ou manipuladas geneticamente, a sua multiplicação na rizosfera e estabelecimento no interior da planta no campo, onde ocorre a competição com estirpes nativas e outros microrganismos. Entretanto, faltam técnicas metodológicas que possam ser usadas rotineiramente, permitindo uma diagnose segura do sucesso do estabelecimento de determinada estirpe na planta, principalmente no estágio inicial de crescimento. Estes fatores constituem a principal barreira para a indicação de estirpes adequadas para a inoculação de cereais.

Diferentes métodos, incluindo teses bioquímicos, imunológicos, fisiológicos, mutação de estirpes para resistência a antibióticos e técnicas moleculares foram desenvolvidos e propostos para superar essas dificuldades.

Por sua alta aplicabilidade acadêmica e prática, os testes imunológicos têm recebido atenção crescente nas pesquisas sobre associações biológicas. Esses métodos baseiam-se na extraordinária capacidade discriminatória dos anticorpos, em razão da habilidade do sistema imune dos vertebrados em produzir uma variedade virtualmente ilimitada dessas imunoglobulinas, sendo cada uma dotada de afinidade singular para compostos específicos.

As técnicas serológicas foram inicialmente usadas na microbiologia clínica ou médica (Brock & Madigan, 1988), cujo princípio básico é a interação antígeno-anticorpo. De acordo com esses autores, antígenos são substâncias que podem ser capturadas especificamente pelos anticorpos do sistema imune dos vertebrados. Quando injetados de maneira apropriada em animais, os antígenos elicitam uma resposta imune, iniciando a síntese de anticorpos específicos, sendo referidos como imunógenos. Os anticorpos são direcionados para partes restritas de uma macromolécula, chamadas de determinantes antigênicos. Cada componente induzindo um anticorpo específico é um determinante antigênico, mais frequentemente denominado de epítopo (Boonekamp, 1988).

A parede celular e a membrana plasmática de bactérias gram-negativas são constituídas de uma mistura de lipídios, proteínas e carboidratos complexos que

respondem por 80% da matéria seca da parede celular (Phaff, 1981). A maioria destes constituintes celulares é composta de antígenos com propriedades imunogênicas e, portanto, possibilitam diferenciar serologicamente microrganismos com base em variações na composição destes polímeros.

O uso de anticorpos tem desempenhado papel essencial no desenvolvimento da biotecnologia. Anticorpos são amplamente utilizados em pesquisas básicas e diagnose de doenças humanas e vegetais.

Dois tipos de anticorpos podem ser distinguidos: anticorpos policlonais e monoclonais. Os anticorpos policlonais são purificados a partir de uma fração de soro de sangue de um animal imunizado. Representam uma mistura complexa de anticorpos direcionados contra diferentes determinantes antigênicos e com afinidades diversas (Neumeier, 1984). Estes tipos de soro contém anticorpos produzidos a partir de diferentes clones de célula B (= policlonal) contra vários epítomos do antígeno, além dos muitos anticorpos presentes no sangue do animal antes da imunização.

Em contraste, os anticorpos monoclonais são produzidos por células oriundas de um único clone e, portanto, constituídos de uma única imunoglobulina. O princípio básico é isolar células de linfócitos B produtoras de anticorpos de um animal adequadamente sensibilizado e multiplicar esses clones. Como células de linfócitos B não sobrevivem em cultura de células, elas são fusionadas com células de mielomas, para formar linhagens de células B híbridas (hibridomas), que crescem em cultura, sintetizando exatamente o mesmo anticorpo (Kohler & Milstein, 1975).

Existem vários métodos serológicos usados para detectar e monitorar microrganismos em associações simbióticas, especialmente entre leguminosas e rizóbio, dentre eles, os baseados em imunorreagentes marcados com enzimas como as técnicas ELISA e DIBA.

2.4.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

As determinações imunoenzimáticas, baseadas em imunorreagentes marcados com enzimas, especialmente anticorpos, têm ocorrido em escala crescente nos laboratórios de diagnose.

Ao contrário do uso de testes com radioimunoensaios que apresentam limitações impostas por legislação de vários países, em razão dos riscos que apresentam à saúde e à curta meia vida de seus reagentes, a técnica “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), introduzida por (Engvall & Perlmann, 1971), utiliza reagentes estáveis, livres de limitação de uso e, mais importante, é adaptável tanto aos testes simples como aos automatizados. Outra característica marcante deste método é que antígenos morfológicamente diversos como proteínas, ácidos nucleicos, bactérias, vírus, fungos, dentre outros, têm sido diagnosticados com alta sensibilidade e especificidade. Esses fatos contribuíram para a rápida expansão e aplicação destes procedimentos (Voller & Bidwell, 1986).

ELISA baseia-se na premissa que um imunorreagente pode ser imobilizado na superfície de um suporte sólido, mantendo sua atividade inalterada, enquanto o

imunorreagente recíproco pode ser ligado a uma enzima, de tal modo que a reatividade enzimática e a imunoreatividade deste conjugado também são mantidos (Voller & Bidwell, 1986).

Através desta técnica, a serologia tornou-se uma ferramenta, também importante, para classificação, identificação e detecção de microrganismos em plantas (Clark, 1981; Figueiredo et al., 1977), etapas estas, indispensáveis nos estudos de FBN.

Para os processos simbióticos com rizóbio, os métodos serológicos são amplamente utilizados para identificação de estirpes e incluem também aglutinação, imunodifusão, imunofluorescência.

Kishinevsky & Bar-Joseph (1978) e Kishinevsky et al. (1982), utilizando testes serológicos para identificação de rizóbio, mostraram que ELISA apresenta sensibilidade de 4 a 6 vezes maior que o teste de aglutinação ou de imunodifusão. A maioria dos procedimentos descritos para identificação de rizóbio (Kishinevsky et al., 1982; Olsen et al., 1983; Martenson et al., 1984), têm empregado anticorpos policlonais no sistema de detecção. Como as diferentes espécies de bactérias possuem antígenos comuns, os anticorpos policlonais apresentam alta frequência de reações cruzadas, principalmente entre estirpes de uma mesma espécie, tanto de rizóbio (Wright et al., 1986), como de *Azospirillum* (Dazzo & Milan, 1976; De-Polli et al., 1980; Klossak & Bohlool, 1983), não permitindo a diferenciação entre elas.

Uma maior especificidade das técnicas serológicas tornou-se possível com a introdução da tecnologia de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975). Com esta tecnologia, a produção de anticorpos monoclonais tem fornecido reagentes imunológicos homogêneos e bioquimicamente definidos com especificidade única e extrema habilidade discriminatória. Anticorpos monoclonais apresentam vantagens em relação ao antissoro policlonal em testes serológicos pois reagem com um único determinante antigênico (epítopo) em maior proporção do que com epítomos e/ou antígenos diferentes; estes anticorpos específicos para epítopo único podem ser produzidos mesmo quando imunógenos mistos são usados para imunização (Jordan & Hammond, 1988; Jordan et al., 1989) e também apresentam disponibilidade imediata por um período indefinido, sem perda de qualidade.

Segundo Halk & DeBoer (1985) e Jordan et al., (1989), anticorpos monoclonais específicos para vários patógenos de plantas, incluindo vírus, bactérias, micoplasmas, têm sido produzidos e usados em estudos diagnósticos e taxonômicos.

Wright et al. (1986) produziram anticorpos monoclonais para uma estirpe de rizóbio e mostraram que estes anticorpos podem ser utilizados para detectar a mesma estirpe em cultura e em nódulos de planta. Velez et al. (1988) selecionaram 13 hibridomas capazes de produzir anticorpos para antígenos somáticos de *Bradyrhizobium japonicum* e utilizaram o teste ELISA para avaliar a reatividade destes anticorpos contra 20 estirpes de *B. japonicum*. Estes autores afirmam que embora os antissoros

monoclonais tenham sido mais específicos, os policlonais também identificaram todas as estirpes testadas.

Estudos imunológicos constituem uma das áreas mais negligenciadas nas pesquisas sobre fixação de N_2 associativa envolvendo *Azospirillum*. Em consequência, conhece-se muito pouco a respeito dos antígenos desta bactéria. Os trabalhos disponíveis revelam que anticorpos policlonais podem ser usados com sucesso nos estudos da rizosfera para detectar e enumerar *Azospirillum*. Num dos primeiros relatos sobre o assunto (Schank et al., 1979), células de *Azospirillum* foram identificadas qualitativamente, utilizando anticorpos fluorescentes. Dados similares foram obtidos com outras técnicas imunológicas (Ladha et al., 1982; Matthews et al., 1983; Levanony et al., 1987). Antígenos específicos para *Azospirillum brasilense* foram detectados em exopolissacarídeos e flagelos (Levanony & Bashan, 1989).

O desenvolvimento de marcadores imunológicos utilizando anticorpos monoclonais apresentam perspectivas promissoras também para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas interações entre diazotróficos e gramíneas. Entretanto, as informações pioneiras nesta área são recentes (Scholter et al., 1992) e apresentam expansão limitada até o momento (Scholter et al., 1993). E sua produção exige infraestrutura ainda de custo elevado.

2.4.2. Dot Immunobinding Assay (DIBA)

Os procedimentos serológicos para detecção de bactérias imobilizadas sobre membranas têm sido utilizados há muitos anos. A técnica possui o mesmo princípio do teste ELISA, mas difere no suporte sólido para adsorver o material a ser testado, que é membrana e não microplaca. Mais comumente, a técnica de DIBA envolve aplicação da amostra à membrana e sua incubação em uma solução contendo anticorpo específico. Em seguida é tratada com um conjugado enzimático enzima-anticorpo anti-imunoglobulina que reage com imunoglobulina ligada à membrana. A atividade da enzima é revelada pela adição de um substrato apropriado, que após conversão, precipita para formar um “spot” colorido.

Estudos de caracterização imunológica de microrganismos, especialmente de vírus, utilizando-se DIBA têm sido mais comumente usados por causa de sua simplicidade e aplicabilidade para um grande número de amostras (Lazarovits, 1990).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento e identificação de bactérias diazotróficas

O isolamento de estirpes de *Azospirillum* spp e outros diazotróficos foi efetuado utilizando-se meio semi-sólido, de acordo com a metodologia preconizada por Döbereiner (1980).

Foram coletadas amostras de plantas de milho (raízes, seiva, estigma e grãos em início de formação) e de sorgo (raízes e seiva), além de solo e de outras gramíneas cultivadas em diferentes regiões de Piracicaba (SP), São Carlos (SP), Sete Lagoas (MG) e Alegre (ES). No laboratório, as suspensões, de cada material, foram preparadas em solução salina (NaCl, 0,85%) e transferidas para quatro meios diferentes, NFb, JNFb, LGI e LGI (Döbereiner et al., 1995) contidos em frascos tipo penicilina com 5 ml de cada meio. Após o aparecimento de uma película típica de *Azospirillum* spp., foi efetuada a transferência de parte dela para novo meio de cultura NFb semi-sólido e incubado a 33°C. No início da formação de nova película, as culturas foram riscadas em placas com meio NFb sólido (15g/l de ágar) acrescido de 20 mg/l de extrato de levedura e incubadas durante 4-5 dias a 33°C. Em seguida, as colônias típicas de *Azospirillum* foram testadas em relação à atividade da nitrogenase e

transferidas para placas contendo meio ágar-batata para a purificação final. Os isolados obtidos foram caracterizados e identificados através de aspectos morfológicos das colônias, exames microscópicos e caracterização fisiológica, exigência de biotina e fixação de N_2 na presença de glicose como fonte de carbono (Döbereiner, et al., 1995). Os isolados de diazotróficos selecionados foram armazenados em frascos com meio sólido de cultura ágar-batata, cobertos com óleo mineral esterilizado, para posterior caracterização serológica e bioquímica.

3.2. Caracterização serológica de isolados de diazotróficos

Para a caracterização serológica dos isolados, utilizaram-se antissoros específicos obtidos para as estirpes *A. lipoferum* (sp 7), *A. brasilense* (59b) e *A. amazonense* (A14) consideradas como padrões, através dos métodos ELISA e DIBA. As culturas padrões foram cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-Embrapa, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro.

Cada isolado purificado foi plaqueado em meio de cultura ágar-batata sólido (Döbereiner, 1980). Após 5 dias de crescimento a 32°C, uma colônia isolada foi retirada e inoculada em 50ml de meio líquido NFb ou LGI (Döbereiner et al., 1995), sem corante, contendo 1 g/l de NH_4^+ . Após incubação, sob agitação, durante 48 horas, as culturas de células foram centrifugadas a 4500 xg, durante 8 minutos, e ressuspensas em solução tampão PBS, pH 7,2. A suspensão final foi ajustada a uma

densidade ótica de 0,800 com filtro de 520 nm, o que equivaleu a uma concentração aproximada de 5×10^9 células viáveis por ml, determinada através da técnica de microgotas (Hoben & Somasegaran, 1982).

3.2.1. Preparação do imunógeno e imunização

Para obtenção dos imunógenos, as células de cada uma das estirpes padrões liofilizadas foram rehidratadas com uma solução contendo 10% de sacarose e 5% de peptona esterilizada. Uma alíquota da suspensão de células, através de uma alça de platina, foi transferida e riscada em placa contendo meio ágar-batata sólido. Após 5 dias de crescimento a 32°C, uma colônia isolada foi retirada e transferida para 2 ml de meio NFb líquido, acrescido de 1 g/l de NH_4Cl . Após 24 horas de crescimento a 32°C, transferiu-se 1 ml para erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml do mesmo meio. A cultura foi incubada a 32°C durante 72 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4500 xg durante 10 minutos, ressuspensas em solução tampão PBS, pH 7,2, (8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na_2HPO_4 ; 0,24 g/l KH_2PO_4). Esta operação foi repetida 3 vezes. Após dois períodos de aquecimento de 1 hora a 56°C com intervalo de 20 minutos, cada cultura de células foi centrifugada, ressuspensa em PBS e ajustada a uma densidade ótica de 0,800 à 520 nm. Essa densidade equivale a aproximadamente 10^9 células viáveis por ml, contadas pelo método de microgotas (Hoben & Somasegaran, 1982).

Uma alíquota de 1 ml da suspensão de células, misturadas com adjuvante completo de Freund comercial na proporção de 1:1, foi injetada, por via intramuscular, em um coelho raça Nova Zelândia, com aproximadamente 2,6 kg de peso. Foram efetuados 5 reforços com a suspensão de células misturada com adjuvante incompleto de Freund, proporção 1:1, sendo o primeiro 15 dias após a imunização inicial e os demais com intervalo entre 25-30 dias, até aos 90 dias.

3.2.2. Determinação do título de anticorpos

Para a detecção de anticorpos, o sangue de cada animal imunizado foi coletado, efetuando-se um corte longitudinal na veia marginal da orelha. Depois da coleta, o sangue foi mantido em temperatura ambiente por 2 horas, em seguida deixado em geladeira durante à noite. O soro foi centrifugado a aproximadamente 8000 g, durante 4 minutos, fracionado em alíquotas de 0,5ml e congelado. O soro normal negativo foi obtido um dia antes da inoculação do imunógeno.

Os anticorpos específicos foram detectados através de reações recíprocas entre os antígenos e antissoros de cada espécie bacteriana, utilizando-se diluições seriadas $\frac{1}{2}$ dos antissoros, através dos testes ELISA e DIBA, descritos a seguir. Testes preliminares indicaram a concentração adequada de antígeno a ser utilizada para cada estirpe.

3.2.3. Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA

Neste teste, avaliou-se o relacionamento serológico de 173 isolados de origens diversas, através de reações recíprocas contra as espécies *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*. Uma colônia de cada estirpe, isolada em meio de batata sólido, foi transferida para meio NFb líquido e incubada por 72 horas a 32-34°C, sob agitação leve. Após este período, as células foram centrifugadas, lavadas, ressuspensas em PBS e ajustadas a uma densidade ótica de 0,800 D.O. a 520 nm.

Utilizou-se a técnica ELISA indireto como descrito por Ahmad et al., (1981) com modificações. Alíquotas de 100 µL foram adicionadas em cada cavidade da placa Elisa e incubadas durante a noite, a 37°C. No dia seguinte, o antígeno foi descartado e a placa lavada 3 vezes com PBS, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e seca. Após a adição de 250 µL de uma solução de saturação (PBS com 0,5% de caseína, PBS-C) e incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a placa foi lavada novamente 4 vezes. Em seguida, adicionou-se o primeiro anticorpo, (antissoro contra *A. lipoferum*, *A. brasilense* ou *A. amazonense*) e deixou-se à temperatura ambiente por 2 horas. Após 5 lavagens e secagens, foram aplicados 100 µL de uma solução de anti-imunoglobulina de coelho, conjugada com fosfatase alcalina, diluída 1:3000 em PBS-T, e incubou-se novamente durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem final, foram adicionados 100 µL da solução do substrato, p-nitrofenol (PNP) na concentração de 1 mg/ml e a absorbância resultante foi medida a 405 nm, com um espectrofotômetro Mutiskan.

3.2.4. Dot-immunobinding assay - DIBA

No teste DIBA, utilizou-se a metodologia preconizada por Lazarovits, (1990), com modificações. Utilizou-se um aparelho para microfiltração dot-blot (Bio-Rad) constituído basicamente de uma placa superior com 96 cavidades, similar à placa para ELISA, uma lâmina de plástico seladora; uma placa suporte da lâmina seladora e uma base com saída para conexão a fonte de vácuo.

A membrana de nitrocelulose, previamente umedecida em TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 500mM NaCl), foi fixada adequadamente entre a placa de 96 cavidades e a lâmina seladora. Uma alíquota de 100 μ L do antígeno em consideração foi depositada em cada cavidade da placa superior e deixada filtrar pela força da gravidade. Após a drenagem completa da amostra, adicionaram-se 200 μ L de TTBS-caseína (TBS; Tween 20, 0,05%; caseína, 0,5%) em cada cavidade e deixou-se drenar novamente sem vácuo. Em seguida, efetuaram-se 3 lavagens consecutivas da membrana, adicionando-se 300 μ L de TTBS por cavidade e drenando a vácuo. Então, aplicaram-se 100 μ L do primeiro anticorpo específico e após drenagem completa por gravidade, o excesso foi removido a vácuo. Lavou-se novamente por 3 vezes consecutivas com 300 μ L de TTBS e adicionou-se o segundo anticorpo, anti-imunoglobulina de coelho conjugada com fosfatase alcalina. Após filtragem completa por gravidade, efetuou-se nova lavagem por 2 vezes. A detecção foi feita com a solução de substrato com 5-bromo-cloro-2-indolfosfato (BCIP) e o corante cloreto de 4-nitro azul de tetrazólio (NBT), 300 μ L por cavidade. Depois da drenagem por gravidade, aplicaram-se 200 μ L de água destilada,

incubando no escuro por 30 minutos. A membrana foi removida do aparelho, lavada em água destilada e seca ao ar. As reações positivas aparecem como “spot” coloridos e as negativas sem cor.

3.3. Ocorrência natural de endofíticos diazotróficos em milho e sorgo

Os antissoros específicos para *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* foram utilizados para determinar a presença destes serogrupos de bactérias em seiva de 63 genótipos de milho e 10 genótipos de sorgo, cultivados no campo, sem inoculação artificial.

Para a obtenção de seiva, coletaram-se 3 plantas de cada um dos genótipos testados. As plantas foram transportadas para o laboratório, onde os colmos foram limpos e desinfetados com álcool. Em seguida, os colmos foram cortados, e os entrenós submetidos a pressão positiva de ar para coleta de aproximadamente 2 ml de seiva, em tubos de ensaio esterilizados. Antes de ser testada, a seiva foi filtrada, usando um pré-filtro (Millipore AP25 025 00), para eliminação de partículas em suspensão. As amostras de cada material foram avaliadas utilizando-se os testes ELISA e DIBA, como descritos no itens 3.2.3 e 3.2.4, respectivamente.

3.4. Caracterização bioquímica de isolados de diazotróficos

Com o objetivo de confirmar a variabilidades encontrada entre os isolados em termos serológicos e morfológicos, avaliou-se o padrão bioquímico de 25 isolados,

selecionados com base no relacionamento antigênico entre eles, incluindo representantes dos serogrupos previamente determinados. As estirpes foram testadas usando o kit API 20E (Appareils et Procédes d'Identification- API System S.A., A., France), fornecido pela BIO-LAB, composto de diferentes carboidratos e enzimas importantes no metabolismo microbiano.

Inicialmente, cada isolado foi reavaliado quanto à sua pureza, através da riscagem em placa com meio ágar-batata sólido. As galerias do kit API foram preparadas de acordo com as recomendações do fornecedor. Uma colônia isolada de cada estirpe foi diluída em 5 ml de água destilada esterilizada e inoculada nas galerias. Após 18 e 24 horas a 33°C, efetuou-se a leitura das reações positivas e negativas, com base nas alterações de cor, em função dos indicadores.

3.5. Resposta de genótipos de milho à inoculação com *Azospirillum* spp.

3.5.1. Efeito da inoculação com *Azospirillum* sobre a morfologia do sistema radicular, crescimento e acúmulo de nutrientes em milho

Para avaliar o impacto da inoculação com estirpes homólogas de *Azospirillum*, isto é, isoladas de milho, sobre a morfologia do sistema radicular e no crescimento de milho conduziu-se um experimento em casa-de-vegetação, em solução nutritiva, de acordo com método preconizado por Schwarz & Geisler (1991).

Utilizaram-se 5 cultivares de milho: CMS 13, CMS 36, BR 451, Sintético Elite e CMS 51, do Banco de Germoplasma da Embrapa/Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Essas cultivares foram selecionadas no campo, sob estresse de N, e consideradas contrastantes para eficiência no uso de N e/ou para FBN (Marriel et al., 1991).

As sementes foram desinfetadas superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio (5%), durante 1 hora, e lavadas com água destilada esterilizada por 5 vezes. Quinze sementes de cada genótipo foram colocadas, de modo equidistante, sobre uma placa de acrílico medindo 50 x 40 cm, coberta com uma folha de papel de filtro e fixadas com tiras do mesmo papel medindo 50 x 10 cm. Estas placas foram colocadas inclinadas, aproximadamente 15 graus, e distanciadas 1,5 cm uma da outra, em um recipiente plástico, com capacidade para 140 L (Apêndice 1). As raízes foram banhadas até a altura das sementes com uma solução nutritiva com a seguinte composição (mg/L): NH_4NO_3 , 10; KH_2PO_4 , 136; K_2SO_4 , 89; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 429; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 442; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,52; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,22; CuSO_4 , 0,07; $(\text{NH}_4)\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,37; H_3BO_3 , 0,74 e Fe-Chelat (“Sequestren”), 25.

Esta solução, contida em tanque separado, era bombeada para o recipiente em intervalos de 2 horas durante o dia e 4 horas durante à noite. A solução foi trocada a cada período de 7 dias.

Para a inoculação, utilizou-se uma mistura de 4 estirpes homólogas de *Azospirillum*, sendo 2 obtidas a partir de raízes e 2 de seiva. As células de cada estirpe foram multiplicadas em meio Nfb líquido com 1 g/l de NH_4^+ até a fase logarítmica,

lavadas e ressuspensas em solução salina (0,85 % de NaCl). A concentração de células foi ajustada para 5×10^9 células viáveis por ml de suspensão, na contagem em placa pelo método da microgota.

As características morfológicas das raízes foram avaliadas aos 18 dias após a germinação através da contagem das intersecções entre as raízes e as linhas horizontais de um grid constituído de uma folha de plástico riscada com espaços de 2cm. As características resultantes foram assumidas como soma de intersecções. Este parâmetro combina número e comprimento de raízes seminais e laterais.

As somas de intersecções foram analisadas para o perfil do sistema radicular inteiro e para 3 zonas diferentes de profundidades de raízes (A = 0 - 12 cm; B = 12 - 24 cm e C = 24 - 36 cm).

Dois dias após, as plantas foram removidas dos vasos, separando-se o sistema radicular da parte aérea. Os materiais, após secagem a 65°C em estufa com circulação forçada de ar, foram pesados e triturados em moinho tipo Wiley, equipado com peneira 60 mesh, para determinação dos teores de macro e micronutrientes por espectrofotometria de plasma induzido.

3.5.2 Efeito da inoculação com *Azospirillum* spp. sobre a atividade da redutase do nitrato

A atividade de redutase do nitrato *in vivo* foi determinada de acordo com o método proposto por Hageman & Reed (1980), com modificações.

A amostragem de folhas e de raízes para a determinação da enzima foi efetuada entre 9 e 10 horas da manhã. A parte mediana das folhas mais novas totalmente expandida, sem nervuras, de 5 plantas, constituíram cada amostra dos tratamentos analisados. As amostras coletadas foram colocadas imediatamente em um isopor contendo gelo. No laboratório, os materiais foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm e pesadas. Incubou-se 0,250 g de folha ou 500 mg de raízes de cada amostra em um meio de incubação constituído de 0,1M de K_2HPO_4 , pH 7,5; 0,1M KNO_3 ; 1% de n-propanol e 0,05% de Neutronix a 0,05%) em banho maria a 30°C, no escuro. Após incubação de 10 e 40 minutos, uma alíquota de 0,5 ml do meio de incubação de cada amostra foi retirada e adicionada a 2,5 ml de água destilada e 3,0 ml da solução contendo 1% de sulfanilamida dissolvida em HCl 1,5 N. O nitrato produzido foi quantificado pela adição de N (1-naftil) etilenodiaminodihicloreto a 0,02%, após 20 minutos do início do desenvolvimento de cor e a absorbância lida em espectrofotômetro, a 540 nm. Com base em uma curva padrão, obteve-se a concentração em micromoles de $NO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ de matéria fresca de folha e de raízes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e identificação de bactérias diazotróficas

De uma maneira geral, comparados com outros grupos de microrganismos, as bactérias apresentam elevada diversidade na rizosfera e endorrizosfera das plantas e somente pequena parcela desses organismos é conhecido (Hawksworth, 1991).

O aproveitamento do potencial das diferentes associações estudadas recentemente como fonte complementar ou substituta de fertilizantes químicos para a agricultura depende do entendimento das interações entre micro e macro-simbionte, que ainda é insipiente. Deste modo, torna-se imperativo identificar microrganismos importantes envolvidos nesse processo.

A introdução do meio semi-sólido como condição para o crescimento de diazotrófico dependente de fixação biológica de N_2 (Döbereiner & Day, 1976) em simbioses associativas, tem permitido grande avanço no isolamento e identificação de novas bactérias com relativa facilidade, embora sua comprovação definitiva como diazotrófico seja mais complexa. O princípio básico deste método é o crescimento seletivo desses organismos com baixa pressão parcial de oxigênio. Com base neste fato,

procurou-se neste trabalho dar ênfase ao isolamento a partir de seiva de plantas , especialmente, milho e sorgo.

A partir de amostras coletadas sob diferentes condições edafoclimáticas foram isolados, purificados e caracterizados, preliminarmente, através do aspecto de crescimento da cultura em meio semi-sólido com aparecimento de película típica, características morfológicas de colônias e de células observadas sob microscópio, e de atividade da nitrogenase. Foram obtidos 620 isolados de bactérias endofíticas e não endofíticas com características de diazotróficos, oriundas de solo, raízes lavadas e desinfestadas superficialmente, grãos imaturos de milho, estigma não emergido da espiga em formação e seiva de milho e de sorgo.

De acordo com os critérios recomendados por Döbereiner et al. (1995), que, além das demais características, incluem habilidade das estirpes de fixar N_2 usando glicose como fonte de carbono e exigência de biotina como fator de crescimento, avaliou-se um grupo de 157 isolados de origens diversas (Apêndice 2). Embora esse grupo tenha sido escolhido ao acaso, encontrou-se somente as espécies *A. lipoferum* ou *A. brasilense*. Esses dados estão de acordo com Krieg & Döbereiner (1986) que afirmaram ser a maioria das estirpes isoladas de gramíneas referida como *A. lipoferum* ou *A. brasilense*. Entretanto, vários isolados não se enquadraram nas espécies já identificadas e foram incluídas como gêneros não determinados. Döbereiner et al. (1993) considerou que, na maioria das simbioses associativas, ainda não se conhece o diazotrófico principal responsável pela fixação biológica. Observou-se, ainda, alta

heterogeneidade morfológica de colônias entre os isolados (Figuras 1, 2, 3 e 4), indicando também a presença de outras bactérias associadas às plantas amostradas, além das espécies já descritas. Analisando-se alguns dados de acordo com o material de origem (Tabela 1), nota-se que foi possível isolar indistintamente *A. lipoferum* e *A. brasilense* de todos os órgãos da planta de milho, exceto de estigma, onde ocorreu só *A. lipoferum*. Entretanto, esses resultados talvez não representem colonização preferencial, visto que, torna-se possível enriquecer culturas e isolar microrganismos a partir de baixa densidade inicial na amostra e, conseqüentemente, sem importância ecológica neste habitat específico.

Como se esperava, obtiveram-se vários isolados a partir de seiva de milho e de sorgo, dada a preferência destas bactérias por ácidos orgânicos, especialmente ácido málico, comum em seiva de plantas de milho (Butz & Long, 1979; Tarrand et al., 1978). Döbereiner (1983) considerou o xilema como sítio adequado para a colonização e fixação de N₂ em função da disponibilidade de fonte de carbono e também da presença de taxa reduzida de oxigênio, o que é essencial para a atividade da nitrogenase. Vários outros diazotróficos têm sido isolados de diferentes órgãos de diferentes espécies (Boddey et al., 1995). As tentativas de se isolar as outras espécies de bactérias fixadoras já descritas na literatura não apresentaram sucesso, indicando uma menor distribuição dessas bactérias nos materiais analisados. Estirpes de *A. amazonense* foram raramente obtidas a partir da seiva de milho, enquanto *Herbaspirillum* spp. ou *Acetobacter diazotrophicus* não foram isolados, mesmo utilizando os meios específicos (Döbereiner et al., 1995).

Tabela 1 - Ocorrência de diferentes espécies de *Azospirillum* em algumas das amostras analisadas.

Amostragem	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. amazonense</i>
Raiz de Sorgo	5 (9)	4 (9)	2 (9)
Raiz de Milho	7 (9)	2 (9)	2 (9)
Seiva de Milho	4 (9)	5 (9)	1 (9)
Seiva de Sorgo	5 (9)	4 (9)	1 (9)
Grãos de Milho	6 (9)	1 (9)	0 (9)
Estígma de Milho	5 (5)	0 (5)	0 (5)
Raiz de Capim Colonião	3 (5)	2 (5)	1 (5)

Os números entre parênteses significam total de amostras analisadas.



41



Figura 1 - Heterogeneidade morfológica de colônias de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas.

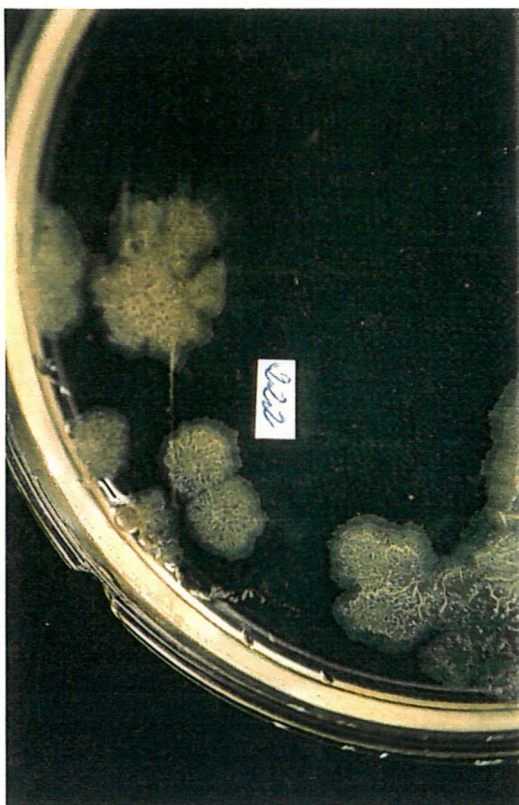
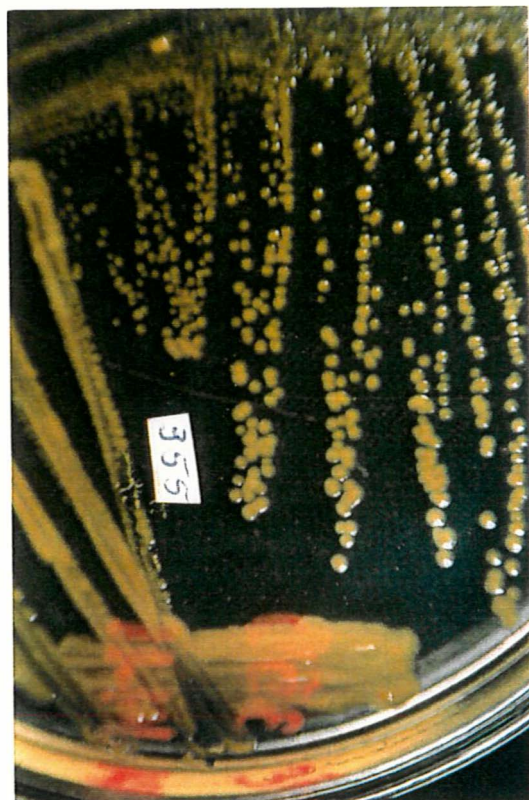


Figura 2 - Heterogeneidade morfológica de colônias de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas.



43



Figura 3 - Heterogeneidade morfológica de colônias de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas.



44

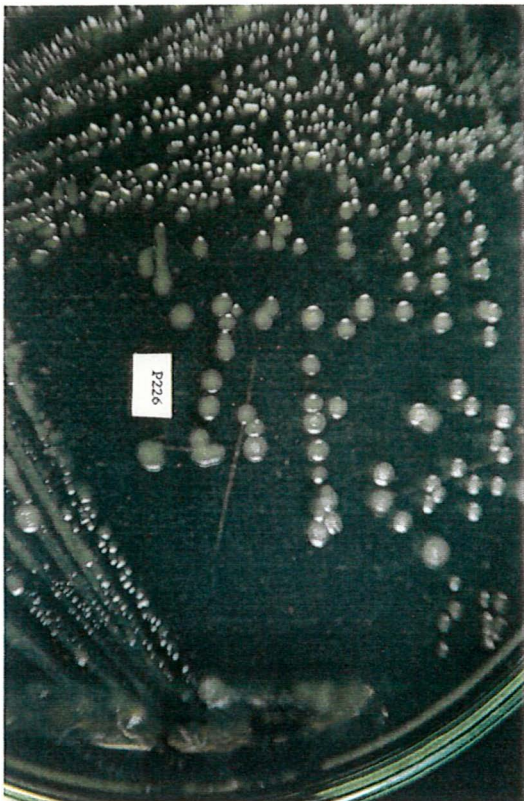


Figura 4 - Heterogeneidade morfológica de colônias de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas.

4.2. Caracterização serológica de bactérias fixadoras de N₂

A detecção de diazotróficos associados às gramíneas e cereais não apresenta dificuldades, mas, distinção entre os vários organismos que colonizam as rizosferas das plantas e definição de qual desempenha o papel mais importante nos processos interativos com o hospedeiro, torna-se bastante complexo. Uma das dificuldades ocorre pela falta de metodologias precisas e que permitam a análise de elevado número de amostras. Os métodos serológicos têm sido utilizados com sucesso em diferentes circunstâncias.

Utilizaram-se os soros policlonais específicos, obtidos em coelho, contra as espécies de *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* para a caracterização serológica de parte dos isolados obtidos, através das técnicas de ELISA e DIBA. Através do teste ELISA, as reações recíprocas entre 157 diferentes isolados e as estirpes consideradas padrão mostram o relacionamento antigênico entre os isolados e possibilitaram estabelecer seis serogrupos distintos (Tabela 2, Figura 5). As reações positivas e com alta valor para a leitura de absorvância indicam proximidade antigênica, enquanto, leituras negativas ou com baixo valor de absorvância sugerem pouca similaridade serológica.

Tabela 2 - Identificação numérica de bactérias diazotróficas, isoladas de origens diversas, agrupadas serologicamente através do teste ELISA.

Serogrupo 1	186	188	189	191	193
	195.1	198	220	222	224.1
	226	236	249	31.1	42.1
	53	54	164.1	224	
Serogrupo 2	177	177.1	195	200	201.1
	215	215.1	216	217	219
	223	223.1	225	228	230
	234	235	237	238	240
	243	245	245.1	253	13.1
	15	15.1	22.2	29.1	31
	33	34	43	43.1	97
	98	125	125.1	132.1	157
	164	165			
Serogrupo 3	178,1	199	201	218	222,1
	233	254	259	13	13,2
	18	33,1	23	28	29
	30	37	38	38,1	41
	46	99	157,1	160	161
	161,1	162,1	167	168	168,2
	170	173	14	22	22,1
Serogrupo 4	179,1	213	226,1	242	12
	21	41,1	43,2	44	56
	158	158,1	159,1	166	169
	171	172	176		
Serogrupo 5	174	175,1	176,1	178	182
	187	189,1	192	194	196
	197	215,2	221	229	236,1
	239	241	244	246	248
	250	251	252	255	257
	2	20	20,1	20,2	30,1
	36	42	45	45,1	71
	71	79	95	95,1	101
	101,1	119	132	159	168,1
175	256	103			
Serogrupo 6	214	227			

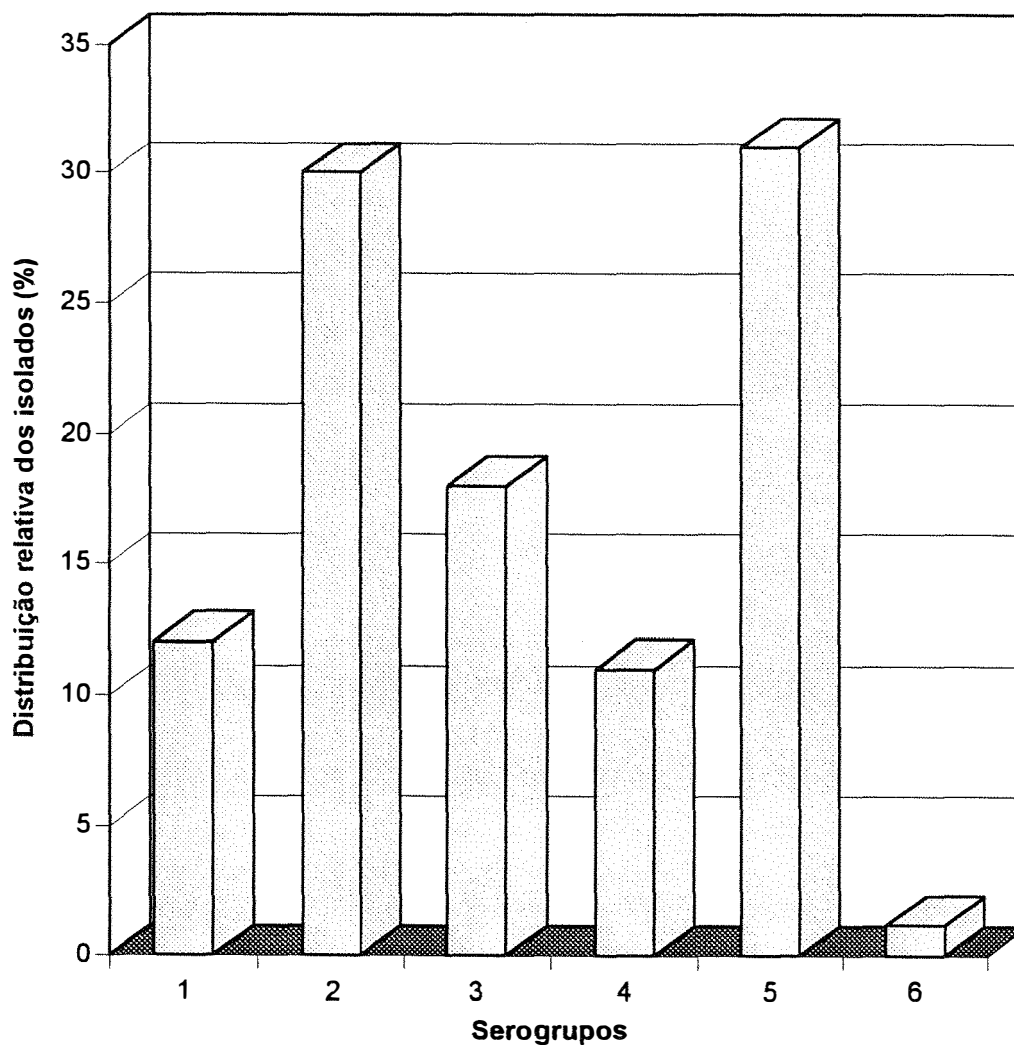


Figura 5 - Classificação serológica de 157 isolados de bactérias diazotróficas obtidos de diversas origens, através do teste ELISA.

Serogrupo 1 - Reação positiva dos isolados com o antissoro contra *A. lipoferum*.

Serogrupo 2 - Reação positiva dos isolados com o antissoro contra *A. brasilense*.

Serogrupo 3 - Reação positiva dos isolados com os antissoros contra *A. lipoferum* e *A. brasilense*.

Serogrupo 4 - Reação positiva dos isolados com os antissoros contra *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*.

Serogrupo 5 - Reação negativa dos isolados com os antissoros contra *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*.

Serogrupo 6 - Reação positiva dos isolados com os antissoros contra *A. lipoferum* e *A. amazonense*.

A literatura disponível sobre estudos imunológicos em *Azospirillum* é limitada, mesmo com anticorpos policlonais. E, nestes casos, ocorrem reações cruzadas com alta frequência, dada a existência de antígenos comuns entre e dentre este gênero de bactéria (Dazzo & Milam, 1976; De-Polli et al., 1980). Entretanto, a introdução de metodologias mais modernas, com as técnicas ELISA e DIBA, permitiu melhorar a eficiência dos testes serológicos com antissoros convencionais. Neste trabalho, notou-se acentuada diversidade serológica entre os 157 isolados testados, tomados ao acaso, sendo que em torno de 12% dos isolados reagiram especificamente com o antissoro produzido contra *A. lipoferum* e 24% reagiram com o de *A. brasilense*, além dos isolados que apresentarem antígenos comuns com duas ou mais espécies. Uma estirpe mutante de *Azospirillum*, *A. brasilense Cd* tem sido quantificado especificamente na rizosfera de vários cereais (Levanony et al., 1987). Vale salientar o fato de aproximadamente 32% dos isolados não terem reagidos com nenhuma das espécies testadas como padrão e, conseqüentemente, não apresentam antígenos comuns com estas bactérias, indicando que tais bactérias podem incluir microrganismos ainda desconhecidos, mas, importantes nas interações com as respectivas plantas hospedeiras.

Esta distribuição das estirpes não discrimina, entretanto, as reações fracamente positivas das fortemente positivas. Mas, permite, com segurança, a classificação dos isolados nos respectivos grupos serológicos, pois a amostra somente foi considerada positiva quando apresentou valores de absorbância acima de 1,5 vezes o do controle, no teste ELISA. Em geral, houve estreita concordância entre os grupos

definidos serologicamente a identificação prévia efetuada com base nas observações microscópicas, morfológicas e nutricionais, indicando a validade das metodologias utilizadas. Consequentemente, estas técnicas serológicas podem desempenhar papel importante nas pesquisas relacionadas às relações associativas.

Em relação ao nível de sensibilidade dos testes serológicos utilizados, comparando-se as técnicas ELISA e DIBA, obteve-se o limite para detecção de *Azospirillum* em suspensão de células, através de reações recíprocas entre *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*. Os resultados apresentados na Tabela 3 e Figura 6 mostram, além do limite de detecção, a especificidade de reação dos antígenos bacterianos para os antissoros homólogos. Utilizando-se a concentração do antígeno em torno de 10^7 de células, torna-se possível discriminar cada espécie de *Azospirillum* em suspensão. Comparando-se os valores apresentados, nota-se que as técnicas ELISA e DIBA apresentaram o mesmo nível de sensibilidade para detecção de células, isto é, em torno de 10^5 a 10^6 células viáveis por ml, quando se considera os antígenos e antissoros homólogos, dependendo da espécie de bactéria. Esses valores estão um pouco acima daqueles mencionados por Levanony (1987) em teste ELISA, 10^4 células viáveis por ml, provavelmente devido à bactéria ou ao método de contagem utilizados.

Independente dos métodos empregados, a estirpe 59b, representante da espécie *A. lipoferum*, parece mais reativa que a espécie *A. brasilense* sp7. Ahmad et al. (1981), através do exame de diversidade serológica entre isolados de rizóbio, concluíram que a reatividade em ELISA estava correlacionada com a morfologia da colônia. Estirpes da bactéria com colônias secas pareciam mais reativas que as de colônias úmidas.

Tabela 3 - Limite de detecção de *Azospirillum* spp. em suspensão de células e especificidade dos antissoros, determinados através do teste ELISA.

Antígenos	Concentração		Antissoros		
	n ^o células/ml		59b	sp7	A14
Ag. <i>A. lipoferum</i> 59b	10 ⁸		0,520	0,375	0,060
	10 ⁷		0,475	0,000	0,000
	10 ⁶		0,358	0,000	0,000
	10 ⁵		0,028	0,000	0,000
	10 ⁴		0,000	0,000	0,000
Ag. <i>A. brasilense</i> sp7	10 ⁸		0,462	0,401	0,000
	10 ⁷		0,198	0,386	0,000
	10 ⁶		0,000	0,095	0,000
	10 ⁵		0,000	0,000	0,000
	10 ⁴		0,000	0,000	0,000

A14 = *A. amazonense*.

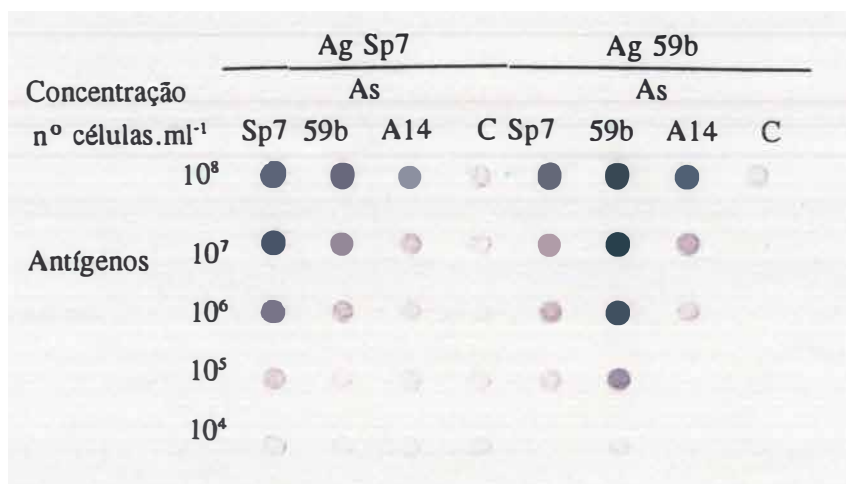


Figura 6 Limite de detecção de *Azospirillum* spp. em suspensão de células e especificidade dos antissoros, determinados em reações cruzadas entre os diferentes antígenos (Ag) e antissoros (As), através do teste DIBA.

Sp7 = *A. brasilense*; 59b = *A. lipoferum*; A14 = *A. amazonense*

C = controle positivo

Spot colorido = reação positiva

Spot rosa pálido ou sem cor = reação negativa

4.3. Ocorrência natural de endófitos diazotróficos em milho e sorgo

A metodologia básica, recomendada para o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio, indica que a fixação biológica em simbiose associativa ocorre onde a pressão parcial de oxigênio for reduzida e onde houver disponibilidade de fonte de carbono (Döbereiner et al., 1995). Como ainda não se conhece o principal organismo envolvido na fixação biológica associada à cultura do milho, justifica-se o interesse nessa cultura.

Dentre as amostras utilizadas para o isolamento de diazotróficos, utilizou-se a seiva de milho e de sorgo. Notou-se, desde o início da pesquisa, que existia certa facilidade para a obtenção de bactérias com determinadas características, que foram em seguida, identificadas como *Azospirillum lipoferum*. Esta bactéria ocorre associada a diferentes plantas hospedeira, tipo de solo e de clima (Döbereiner & Pedrosa, 1987). Entretanto, outras bactérias foram também isoladas e purificadas, embora em número bem mais restrito do que a partir da rizosfera, onde se encontrou maior diversidade de microrganismos diazotróficos.

Uma vez ajustada a concentração adequada de antígeno e de antissoro para o teste ELISA e para DIBA, avaliou-se preliminarmente a ocorrência de serogrupos definidos previamente em diferentes amostras. Inicialmente em número reduzido de amostras de seiva, observou-se somente o serogrupo com antígeno comum à espécie *A. lipoferum*. Numa outra etapa, avaliaram-se 28 genótipos com reações contra os

antissoros de *A. lipoferum* de *A. brasilense*, através da técnica DIBA. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 7. Observou-se uma reação altamente específica com *A. lipoferum*, indicando uma predominância quase absoluta desta espécie em seiva de plantas de milho. Isto não significa que exista somente esta bactéria nestas plantas, mas sugere uma população mais elevada desta espécie, considerando que a sensibilidade do método está em torno de 10^5 a 10^6 células viáveis por ml, como mostrado para ELISA e DIBA (Tabela 3, Figura 6).

Em outro ensaio, utilizou-se o teste ELISA para se avaliarem de 63 genótipos de milho e 10 de sorgo. Os dados demonstraram a ocorrência de 85% de reações positivas com *A. lipoferum* e de 6 % de positivas com *A. brasilense* (Figura 8), confirmando a predominância do primeiro grupo. Os dados mostraram desde reações fracamente positivas a fortemente positivas, indicando o efeito de genótipos sobre a associação milho-diazotróficos. As variações nos valores de pH e na composição de macro e micronutrientes na seiva destas plantas (Tabela 4), provavelmente, explicam parte das diferenças encontradas entre genótipos.

Outros endófitos têm sido obtidos a partir de tecidos de diferentes plantas, à semelhança de *Acetobacter diazotrophicus* em cana de açúcar (Döbereiner et al., (1993). Esses dados são consubstanciados pelas descobertas de Pereira et al., (1988) que encontraram 70% da população de diazotróficos estabelecidos em colmo de sorgo inoculado com *A. lipoferum* como inoculante. As primeiras evidências de especificidade entre diazotróficos e cereais foram relatadas por Baldani et al. (1986). Estirpes isoladas

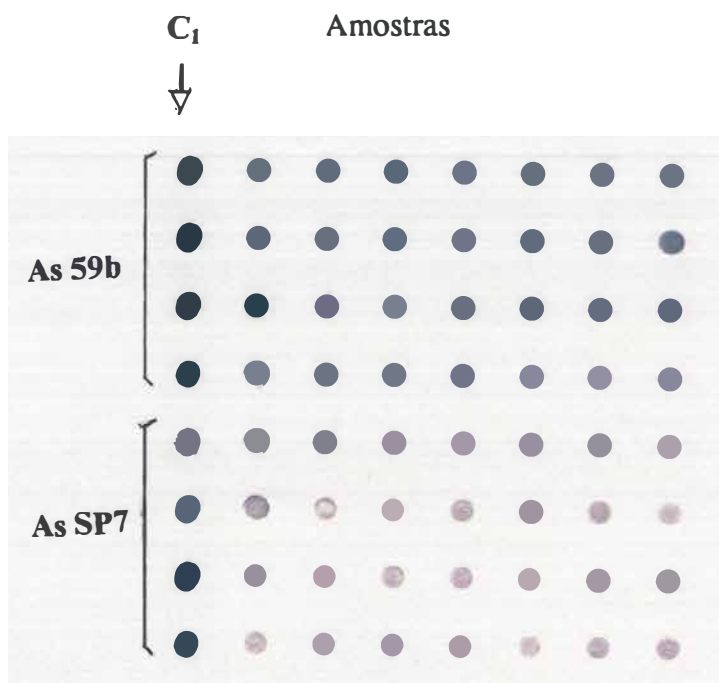


Figura 7 Ocorrência natural relativa dos serogrupos *A. lipoferum* (59b) e *A. brasilense* (Sp7) em amostra de seiva de 28 genótipos de milho cultivados no campo, sem inoculação artificial, determinada através do teste DIBA.

C = controle positivo

Spot colorido = reação positiva

Spot rosa pálido ou sem cor = reação negativa

de plantas C_4 são mais atraídas por malato enquanto as de C_3 são atraídas por oxalato (Reinhold et al., 1985). A presença de ácido málico em seiva de milho tem sido considerada como fator responsável pela maior afinidade *Azospirillum* - milho. Mas, faltava uma metodologia para esclarecer esta especificidade, que ainda é controversa. Bashan & Levanony (1990) discutem exemplos onde não se demonstra a especificidade entre *Azospirillum* e gramíneas. A consistência dos dados apresentados indica alto grau de colonização natural seletiva de *A. lipoferum* em milho e sorgo.

4.4. Caracterização bioquímica de isolados de diazotróficos

Existem rotinas bem estabelecidas e relativamente simples para a identificação de diazotróficos (Döbereiner et al., 1995), principalmente baseadas em fontes de carbono específicas. As fontes de carbono preferidas para todas as espécies de *Azospirillum* são ácidos orgânicos como succinato, malato e lactato (Okon et al., 1976, Tarrand et al., 1978; Reinhold et al., 1987). Entretanto, existem diferenças interespecíficas no padrão de uso de carboidratos. Sabe-se, por exemplo, que *A. lipoferum* cresce em glicose enquanto *A. brasilense* não se multiplica nesse meio, embora possua via enzimática catabólica para tal (Gobel & Krieg, 1984). Mas, o nível de dificuldade aumenta à medida que cresce o número de isolados a serem trabalhados.

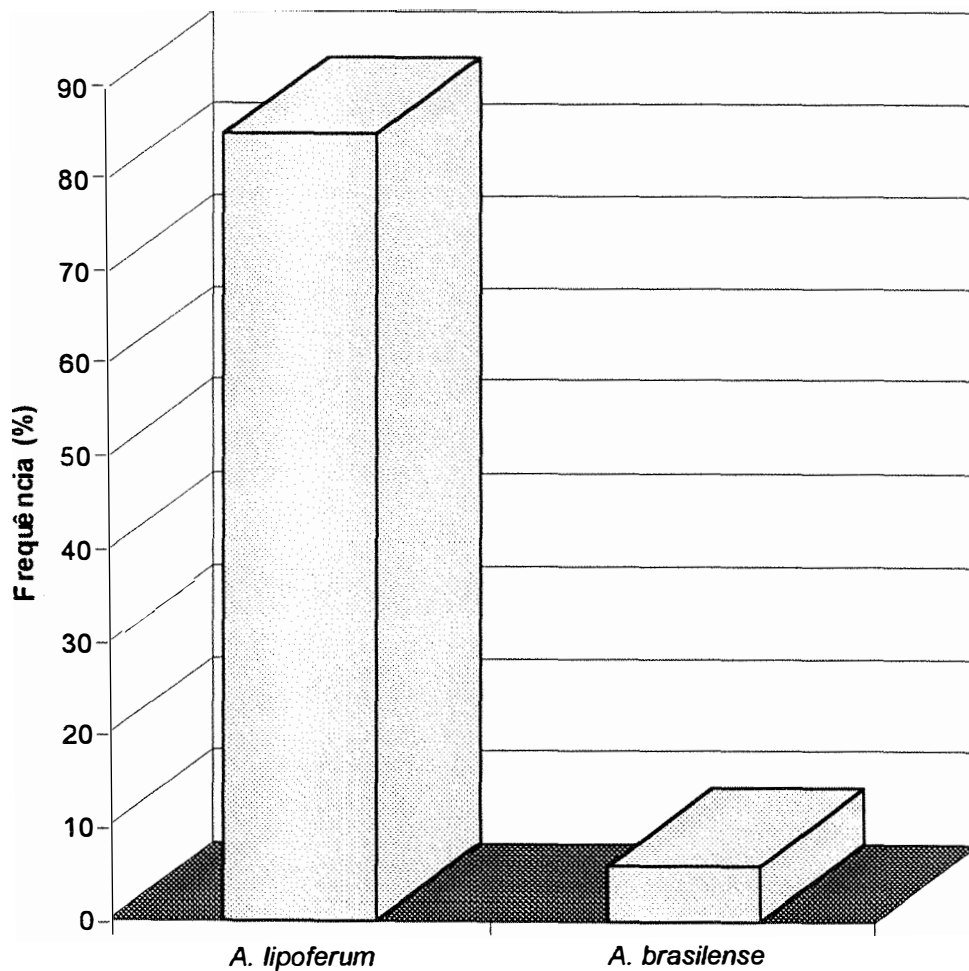


Figura 8 - Ocorrência natural dos serogrupos *A.lipoferum* e *A. brasilense*, em amostras de seiva de 63 genótipos de milho e 10 de sorgo, cultivados no campo sem inoculação artificial, no estágio de florescimento, determinada através do teste ELISA.

Tabela 4 - Valores de pH e teores de alguns macro e micronutrientes em seiva de 12 genótipos de milho, cultivados no campo sem inoculação artificial, no estágio de florescimento¹.

genótipos	pH	macro				micro		
		P	K	Ca	Mg	B	Zn	Mo
	 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$						
3	6,25	54,28	417,14	50,18	30,95	9,84	0,699	0,178
5	6,26	13,13	116,66	17,52	9,87	10,20	0,000	0,132
11	6,46	7,10	485,29	17,52	41,35	9,69	0,268	0,314
12	6,38	69,12	687,74	97,39	52,16	9,61	0,490	0,483
14	6,27	50,52	243,83	98,12	29,98	9,68	0,000	0,396
15	6,10	38,22	400,47	35,63	23,46	9,53	0,163	0,371
16	5,98	52,81	349,41	40,97	16,80	9,39	0,000	0,321
17	6,28	28,59	206,93	47,04	14,72	9,31	0,000	0,187
19	5,80	51,95	312,30	28,10	26,92	9,32	0,000	0,170
20	5,93	44,32	347,94	42,12	25,40	9,55	0,059	0,076
27	6,45	32,22	212,48	38,77	20,96	9,10	0,000	0,088
28	6,67	31,68	192,04	48,40	26,37	9,20	0,117	0,110

¹Cada amostra foi constituída de uma mistura de seiva de três plantas.

Procurou-se avaliar a utilização do Kit API 20E como instrumento de diferenciação de isolados e não como meio de identificação, pois não sendo este específico para os organismos de interesse, seu uso torna-se complexo (Döbereiner, 1989). Por outro lado, kit adequado tem sido usado para identificar outras bactérias fixadoras de N₂ como *Bacillus azotofixans* (Seldin & Penido, 1986). Dos 27 isolados analisados, incluindo uma estirpe de *A. lipoferum* e uma de *A. brasilense*, não foi possível a identificação, com base nos testes contidos no kit utilizado. Entretanto, as

espécies de *Azospirillum* são facilmente eliminadas, somente com base no teste de glicose, que é a fonte de carbono chave para a distinção entre estas espécies (Döbereiner et al., 1995). Como as bactérias do gênero *Azospirillum* utilizam relativamente poucos polissacarídeos (Tarrand et al., 1978), selecionando-se apenas 5 carboidratos foi possível demonstrar variabilidade bioquímica entre os isolados testados (Tabela 5). Os dados bioquímicos confirmam a ampla diversidade de bactérias que podem ser isoladas a partir de gramíneas com características aparente de *Azospirillum*, mas com propriedades bioquímicas, serológicas e morfológicas totalmente distintas e, certamente, desempenhando algum papel na ciclagem de N nos diferentes ecossistemas.

4.5. Respostas de genótipos de milho à inoculação com *Azospirillum* spp.

4.5.1. Efeito da inoculação com *Azospirillum* spp. sobre a morfologia do sistema radicular, crescimento e acúmulo de nutrientes em milho

Os efeitos da inoculação e dos genótipos sobre o crescimento e a incorporação de macronutrientes e micronutrientes na parte aérea das plantas de milho cultivadas em condições de disponibilidade limitada de nitrogênio, podem ser verificados quando se compara os dados apresentados nas Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10. Observam-se efeitos significativos do genótipo da planta sobre o acúmulo de matéria seca na parte

Tabela 5 - Diferenciação bioquímica de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas, através do kit API 20E.

Ident. isolados	gelatina	manose	sorbitol	amidalina	glicose
<i>A. lipoferum</i>	-	-	-	-	+
<i>A. brasiliense</i>	-	-	-	-	-
Isolado 1	+	-	-	-	-
Isolado 2	-	+	-	-	-
Isolado 3	-	-	-	-	-
Isolado 4	+	-	-	-	-
Isolado 5	+	+	+	+	+
Isolado 6	+	+	+	+	-
Isolado 7	-	-	-	-	-
Isolado 8	-	-	-	-	-
Isolado 9	+	-	-	-	-
Isolado 10	-	-	-	-	-
Isolado 11	+	-	-	-	-
Isolado 12	-	+	-	-	+
Isolado 13	-	-	-	-	-
Isolado 14	-	-	-	-	-
Isolado 15	+	+	+	+	+
Isolado 16	+	-	-	+	-
Isolado 17	-	-	-	-	+
Isolado 18	-	+	-	-	-
Isolado 19	+	+	+	-	-
Isolado 20	-	-	-	-	-
Isolado 21	-	-	-	-	+
Isolado 22	-	-	-	-	+
Isolado 23	+	-	-	-	-
Isolado 24	-	-	-	-	-
Isolado 25	+	-	-	-	+

(+) = Reação positiva

(-) = Reação negativa

aérea e dos macronutrientes analisados, independente da presença das bactérias inoculadas. O cultivar CMS 36 apresentou maior crescimento e acúmulo de nutrientes, sendo uma população promissora para ser explorada como fontes de genótipos superiores para fixação biológica de N_2 .

Verifica-se que a produção de massa seca da parte aérea das plantas não foi alterada pela inoculação. Contudo, as concentrações dos macronutrientes, exceto as de cálcio e nitrogênio, foram aumentadas pela inoculação (Tabela 7). Embora tenha ocorrido um acréscimo de 17% no teor deste último.

Por outro lado, os conteúdos de nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre foram significativamente mais elevados nas plantas inoculadas em relação ao controle, plantas não inoculadas, independente dos genótipos (Tabela 8). Este aumento só não foi significativo para o genótipo BR 405, que foi afetado negativamente pela inoculação. Em relação ao cálcio, não se observou efeito da inoculação. De modo similar, houve um aumento no conteúdo de zinco na parte aérea das plantas na presença da inoculação com *Azospirillum*. Os conteúdos dos demais e os teores não foram influenciados por este tratamento (Tabelas 9 e 10). Diferente do observado com a parte aérea, a inoculação não resultou em aumentos significativos sobre as variáveis medidas no sistema radicular, como massa seca e número totais e parciais de intersecções e acúmulo de macronutrientes, exceto teor de nitrogênio (Tabelas 6, 11, 12, 15). Pelo contrário, a inoculação influenciou negativamente a massa seca radicular, embora em níveis não significativos. Enquanto mostrou efeitos positivos em relação aos teores e conteúdos de molibdênio e

Tabela 6 - Acúmulo de matéria seca (g/planta) na parte aérea e nas raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipos					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR.451	S.ELITE	CMS 51	
	Parte aérea					
Com	0,286	0,335	0,224	0,259	0,265	0,274 A
Sem	0,304	0,322	0,278	0,166	0,230	0,260 A
Médias	0,295 ab	0,328 a	0,251 bc	0,212 c	0,248 bc	
	Raízes					
Com	0,258	0,240	0,236	0,152	0,250	0,218 A
Sem	0,277	0,300	0,182	0,197	0,230	0,237 A
Médias	0,267 a	0,270 a	0,209 b	0,175 b	0,218 ab	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 7 - Teores médios de macronutrientes (g kg⁻¹) na parte aérea de genótipos milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipos					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR 451	S.ELITE	CMS 51	
	N					
Com	25,53	23,67	19,77	22,10	22,50	22,71 A
Sem	20,00	18,47	18,00	21,00	19,43	19,38 A
Médias	22,77 a	21,07 a	18,88 a	21,55 a	20,97 a	
	P					
Com	9,77	12,00	11,03	10,77	11,17	10,95 A
Sem	8,00	9,60	8,48	8,97	8,83	8,78 B
Médias	8,89 a	10,80 a	9,75 a	9,87 a	10,00 a	
	K					
Com	73,23	71,80	63,03	61,53	62,23	67,17 A
Sem	49,83	63,60	56,40	52,90	54,73	55,49 B
Médias	61,53 a	67,70 a	59,72 a	57,22 a	60,48 a	
	Ca					
Com	9,97	10,20	9,6	10,03	10,00	9,96 A
Sem	9,00	10,47	8,83	10,70	9,57	9,71 A
Médias	9,48 a	10,33 a	9,22 a	10,37 a	9,97 a	
	Mg					
Com	5,23	5,50	5,40	4,97	5,47	5,31 A
Sem	4,62	5,33	4,60	4,83	4,87	4,86 B
Médias	4,92 a	5,14 a	5,04 a	4,90 a	5,17 a	
	S					
Com	1,87	1,77	1,93	1,83	2,53	1,99 A
Sem	1,40	1,67	1,77	1,80	1,67	1,66 B
Médias	1,63 a	1,72 a	1,85 a	1,82 a	2,10 a	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 8 - Conteúdos médios de macronutrientes (mg/planta) na parte aérea de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipo					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR 451	S. ELITE	CMS 51	
	N					
Com	7,29	7,78	4,55	5,68	5,97	6,26 A
Sem	6,08	5,94	5,02	3,47	4,43	4,99 B
Médias	6,69 a	6,87 a	4,79 b	4,57 b	5,20 ab	
	P					
Com	2,69	4,00	2,46	2,59	2,90	2,70 A
Sem	2,40	3,09	2,32	1,49	2,03	2,30 B
Médias	2,54 ab	3,50 a	2,39 a	2,09 a	2,46 a	
	K					
Com	21,15	24,30	14,05	15,90	17,44	18,57 A
Sem	15,06	20,42	15,69	8,82	12,56	14,51 B
Médias	18,10 ab	22,36 a	14,87 bc	12,36 c	15,00 bc	
	Ca					
Com	2,80	3,36	2,14	2,61	2,62	2,08 A
Sem	2,77	3,37	2,47	1,76	2,19	2,50 A
Médias	2,76 b	3,37 a	2,31 bc	2,19 c	2,40 bc	
	Mg					
Com	1,48	1,82	1,21	1,29	1,42	1,44 A
Sem	1,39	1,71	1,30	0,80	1,11	1,26 A
Médias	1,44 b	1,76 a	1,26 bc	1,05 c	1,27 bc	
	S					
Com	5,29	5,84	4,33	4,76	6,66	5,37 A
Sem	4,24	5,36	4,90	2,98	3,76	4,25 B
Médias	4,76 c	5,60 a	4,62 c	3,87 d	5,21 b	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 9 - Teores médios de micronutrientes ($\mu\text{g g}^{-1}$) na parte aérea de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipos					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR 451	S.ELITE	CMS 51	
Cu						
Com	13,74	14,57	18,72	16,39	14,92	15,67 A
Sem	12,06	17,60	17,69	17,66	15,78	16,16 A
Médias	12,90 a	16,08 a	18,20 a	17,02 a	15,35 a	
Mn						
Com	120,67	128,40	108,51	79,90	103,18	108,13 B
Sem	92,26	103,22	86,07	73,40	82,91	87,57 A
Médias	106,46 ab	115,81 a	97,29 bc	76,65 d	93,04 c	
Mo						
Com	1,51	1,71	1,73	2,11	2,80	1,97 A
Sem	0,72	2,17	1,49	2,49	2,20	1,82 A
Médias	1,12 c	1,94 ab	1,61 bc	2,30 ab	2,50 a	
Zn						
Com	34,66	37,89	39,78	46,18	38,32	39,37 A
Sem	25,30	36,36	35,84	43,55	23,07	32,82 A
Médias	29,98 a	37,13 a	37,81 a	44,86 a	30,70 a	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 10 - Conteúdos médios de micronutrientes ($\mu\text{g/planta}$) na parte aérea de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipo					Média
	CMS 13	CMS 36	BR 451	S. ELITE	CMS 51	
Cu						
Com	3,90 a	4,66 a	4,25 a	4,26 a	3,97 a	4,21 A
Sem	3,64 a	5,71 a	4,98 a	2,86 a	3,57 a	4,15 A
Médias	3,77 a	5,18 a	4,61 a	3,56 a	3,77 a	
Mn						
Com	34,80	42,55	24,15	20,85	27,25	29,92 A
Sem	28,21	33,50	24,26	11,95	19,11	23,41 B
Médias	31,50 b	38,03 a	24,21 c	16,40 d	23,18 c	\
Mo						
Com	0,43	0,55	0,38	0,56	0,73	0,53 A
Sem	0,23	0,70	0,42	0,40	0,48	0,45 A
Médias	0,33 b	0,2 a	0,40 ab	0,48 ab	0,65 a	
Zn						
Com	9,80	12,26	8,85	12,03	9,97	10,58 A
Sem	7,70	11,71	9,93	7,07	5,01	8,28 B
Médias	8,75 c	11,98 a	9,39 b	9,55 b	7,49 d	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

de zinco, a inoculação reduziu os de manganês nas raízes (Tabelas 13 e 14) e, conseqüentemente, não se tratou de efeito de diluição.

As espécies de plantas e mesmo cultivares da mesma espécie diferem na sua habilidade de se desenvolverem sob estresses nutricionais (Gabelman & Gerloff, 1983; Nielsen & Barber, 1978). Genótipos de milho variam na sua composição em macro e micronutrientes (Clark et al., 1974). Essas diferenças tem sido atribuídas aos parâmetros morfológicos e fisiológicos (Kuchenbuch & Jung, 1988).

Os resultados obtidos mostram a importância do genótipo da planta hospedeira nas interações entre milho e as bactérias do gênero *Azospirillum*, corroborando a hipótese de que a resposta da planta aos microrganismo é fortemente regulada por fatores do controle genético do hospedeiro. Isto sugere a possibilidade de se selecionarem genótipos de milho que apresentem maior compatibilidade com bactérias diazotróficas. É importante observar que houve maior resposta à inoculação nos genótipos que foram selecionados como materiais produtivos no campo, em condições de estresse em nitrogênio.

Diferentes pesquisas mostram aumentos no crescimento, N total e produção de milho após inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* (Lin et al., 1983; Sarig et al., 1988). Lin et al. (1983) relatam aumentos na absorção dos íons NO_3^- , H_2PO_4^- e K^+ em segmentos de raízes de milho inoculadas com *Azospirillum*. Dados similares foram observados para plantas de sorgo pelos mesmos autores.

Tabela 11 - Teores médios de macronutrientes (g kg^{-1}) em raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipo					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR 451	S.ELITE	CMS 51	
N						
Com	14,90	16,83	16,43	16,63	15,07	15,97 A
Sem	12,00	13,43	13,07	13,97	12,80	13,05 B
Médias	13,45 a	15,13 a	14,75 a	15,30 a	13,93 a	
K						
Com	39,90	38,67	38,80	41,63	33,00	38,40 A
Sem	36,17	34,43	41,00	34,50	33,00	35,82 A
Médias	38,03 a	36,55 a	39,90 a	38,07 a	33,00 a	
P						
Com	2,79	4,03	2,41	2,82	2,92	3,00 A
Sem	2,45	3,10	2,37	1,46	2,03	2,28 B
Médias	2,62 ab	3,56 a	2,41 b	2,13 b	2,47 b	
Ca						
Com	5,63	5,23	5,70	5,60	5,07	5,45 B
Sem	7,53	6,47	7,17	6,97	6,80	6,99 A
Médias	6,58 a	5,85 a	6,43 a	6,28 a	5,93 a	
Mg						
Com	5,47	5,23	5,50	5,73	5,00	5,39 B
Sem	6,63	5,83	7,00	6,30	6,40	6,43 A
Médias	6,05 a	5,53 a	6,25 a	6,02 a	5,70 a	
S						
Com	4,63	4,80	4,70	5,33	4,43	4,78 A
Sem	5,13	4,83	5,37	4,80	5,23	5,07 A
Médias	4,88 a	4,82 a	5,03 a	5,07 a	4,83 a	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 12 - Conteúdos médios de macronutrientes (mg/planta) em raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipos					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR.451	S.ELITE	CMS 51	
	N					
Com	3,91	4,11	3,91	2,56	3,12	3,52 A
Sem	3,32	4,01	2,36	2,75	2,95	3,08 A
Médias	3,61 a	4,06 a	3,14 a	2,65 a	3,03 a	
	P					
Com	2,43	2,18	1,87	1,19	1,70	1,87 A
Sem	2,32	2,96	1,30	1,30	1,72	1,92 A
Médias	2,38 a	2,57 a	1,58 a	1,24 a	1,71 a	
	K					
Com	9,99	9,22	9,03	6,13	6,59	8,19 A
Sem	10,04	10,42	7,44	6,82	7,59	8,46 A
Médias	10,02 a	9,82 a	8,24 ab	6,48 b	7,09 b	
	Ca					
Com	1,44	1,25	1,33	0,87	1,02	1,18 B
Sem	2,09	1,92	1,32	1,37	1,56	1,67 A
Médias	1,76 a	1,59 ab	1,32 bc	1,12 c	1,29 bc	
	Mg					
Com	1,40	1,24	1,27	0,89	0,99	1,16 B
Sem	1,84	1,78	1,29	1,24	1,47	1,52 A
Médias	1,62 a	1,51 a	1,28 a	1,06 a	1,23 a	
	S					
Com	1,18	1,52	1,09	0,82	0,89	1,03 A
Sem	1,42	1,46	0,99	0,94	1,20	1,20 A
Médias	1,30 a	1,31 a	1,04 a	0,87 a	1,05 a	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 13 - Teores médios de micronutrientes (g kg^{-1}) em raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipos					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR 451	S.ELITE	CMS 51	
	Cu					
Com	32,76	39,84	37,19	39,32	40,20	37,86 A
Sem	31,55	33,72	36,94	33,72	37,57	34,70 A
Médias	32,15 a	36,78 a	37,06 a	36,52 a	38,89 a	
	Mn					
Com	164,47	209,63	237,69	196,24	185,98	198,80 B
Sem	308,62	312,02	335,41	172,32	297,70	285,21 A
Médias	236,54 a	260,82 a	286,55 a	184,28 a	241,84 a	
	Mo					
Com	45,27	49,63	50,37	40,60	52,67	47,71 A
Sem	20,75	29,00	21,20	16,50	21,21	21,73 B
Médias	33,01 a	39,31 a	35,79 a	28,55 a	36,94 a	
	Zn					
Com	101,04	102,22	122,85	112,58	109,01	109,54 A
Sem	97,25	88,59	96,38	89,42	94,04	93,13 B
Médias	99,15 a	95,40 a	109,61 a	101,00 a	101,52 a	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 14 - Conteúdos médios de micronutrientes ($\mu\text{g/planta}$) em raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A.lipoferum* e *A.brasilense*, 20 dias após a germinação. Médias de três repetições.

Inoculação	Genótipos					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR 451	S.ELITE	CMS 51	
Cu						
Com	8,50	9,80	8,73	5,99	8,07	8,22 A
Sem	8,71	10,10	6,66	6,59	8,64	8,14 A
Médias	8,61 a	9,95 a	7,69 a	6,29 a	8,36 a	
Mn						
Com	43,22	51,32	54,00	28,89	34,07	42,30 B
Sem	85,62	93,66	64,41	33,62	68,52	69,16 A
Médias	64,42 a	72,49 a	59,21 a	31,26 a	51,30 a	
Mo						
Com	11,86	11,74	11,99	6,51	10,89	10,60 A
Sem	5,73	8,54	3,89	3,25	4,88	5,26 B
Médias	8,79 a	10,14 a	7,94 ab	4,88 b	7,88 ab	
Zn						
Com	26,01	24,88	28,81	17,65	21,70	23,82 A
Sem	26,92	27,10	17,93	17,66	21,63	22,25 B
Médias	26,45 a	25,99 a	23,37 a	17,65 a	21,67 a	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 15 - Somas parciais e total de intersecções de raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação. Média de três repetições.

Inoculação	Genótipo					Médias
	CMS 13	CMS 36	BR 451	S. ELITE	CMS 51	
	Inters1					
Com	41,017	30,713	30,503	44,497	31,830	35,712 A
Sem	40,165	37,783	30,040	41,487	39,603	37,816 A
Médias	40,591 a	34,248 a	30,272 a	42,992 a	35,717 a	
	Inters2					
Com	22,913	17,653	15,773	19,930	15,832	18,412 A
Sem	17,823	14,030	14,593	12,170	18,800	15,483 A
Média	20,368 a	15,842 a	15,163 a	16,050 a	17,316 a	
	Inters3					
Com	5,857	4,247	2,798	4,536	2,354	3,958 A
Sem	4,693	2,795	2,308	1,858	3,107	2,952 A
Média	5,275 a	3,521 a	2,553 a	3,197 a	2,730 a	
	Inters Total					
Com	70,130	52,625	51,163	68,970	50,013	58,580 A
Sem	62,687	54,613	46,880	55,518	61,517	56,243 A
Média	66,408 a	53,619 a	49,022 a	62,244 a	55,765 a	

Nas linhas, as médias seguidas pela mesma letra minúscula e, nas colunas, da mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Alguns trabalhos sugerem que o processo de fixação biológica não é única causa para o aumento no crescimento das plantas em simbiose associativa. Essas bactérias elicitam substâncias promotoras de crescimento, como AIA (Tien et al., 1979) e aumentam a absorção de minerais pelas raízes (Kapulnik et al., 1985). Kapulnik et al., (1985) encontraram influência positiva da inoculação em trigo, cultivado em solução nutritiva, com concomitante aumento do sistema radicular e atribuíram tais diferenças aos efeitos hormonais. Em contraste, os dados desta pesquisa mostram que o maior acúmulo de nutrientes não foi acompanhado de alterações nas variáveis morfológicas avaliadas no sistema radicular (Tabela 15, Figura 9).

Em relação ao zinco, a inoculação provocou aumento significativo no seu teor e conteúdo nas raízes e conteúdo na parte aérea. É conhecido o papel deste elemento na biossíntese de AIA (Tsui, 1948) e, portanto, importante para a ação hormonal. Assim, os aumentos observados no acúmulo de nutrientes não podem ser atribuídos unicamente aos efeitos hormonais. Ademais, não se observou redução na concentração de N na parte aérea das plantas, efeito esse esperado em função de hormônios. Conclui-se, portanto, que houve contribuição da fixação biológica de N_2 para o crescimento e incorporação de nitrogênio nas plantas inoculadas. Ganhos no crescimento e incorporação de nutrientes em plantas de arroz cultivadas em solução nutritiva e inoculadas com *Azospirillum*, sem aumento da massa radicular, foram também relatados por Murty & Ladha (1988).



Figura 9 - Comparação do sistema radicular do genótipo de milho CMS 51 cultivado em solução nutritiva, inoculado e não inoculado com uma mistura de estirpes homólogas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, 20 dias após a germinação.

Esses resultados encontrados, aparentemente conflitantes, podem ser parcialmente explicados em função da idade da planta e das concentrações de inóculos utilizadas. Bashan & Levanony (1990) e Kapulnik et al. (1985) relataram que suspensões com concentrações elevadas de bactérias inibiram as alterações morfológicas do sistema radicular e que baixas concentrações não apresentaram nenhum efeito. Fallik et al. (1989) reportaram a densidade em torno de 10^7 células viáveis por ml como concentração ótima de bactérias para inoculação em plantas de milho, portanto similar a deste trabalho, $4,0 \times 10^7$ células viáveis por ml. Nos dados apresentados, não se observou alteração na soma total de intersecções e no comprimento da raiz seminal (dados não mostrados). Nota-se que a metodologia foi sensível suficiente para detectar diferenças entre genótipos.

4.5.2. Efeito da inoculação com *Azospirillum* spp. sobre a atividade da redutase do nitrato

Na Tabela 16, estão apresentados os dados médios da atividade da redutase do nitrato nos tratamentos avaliados. Em geral, a atividade da enzima foi baixa no sistema radicular, independente da inoculação e dos genótipos, sendo os efeitos desses tratamentos não significativos. A interação inoculação x genótipos foi

significativa, onde alguns genótipos foram influenciados positivamente pela inoculação e outros negativamente.

Como a redutase do nitrato é uma enzima do tipo indutível pelo substrato (Beevers & Hageman, 1969), os baixos níveis de atividade podem ser parcialmente explicado pela disponibilidade limitada de N utilizada no meio de crescimento das plantas. Por outro lado, na parte aérea das plantas, a atividade da enzima aumentou significativamente na presença da inoculação, sendo a magnitude do acréscimo em função dos genótipos (Tabela 16), indicando que, em milho, inoculado ou não, o nitrogênio absorvido na forma de nitrato é reduzido, principalmente, nas folhas.

O incremento de 3 vezes observado para a atividade da redutase do nitrato na parte aérea pode estar associado ao maior conteúdo de Mo nas raízes e ao de S nas folhas (Tabela 8). Esses dois nutrientes desempenham papel importante na síntese e atividade da enzima, uma vez que ela é rica em grupos sulfídricos (Marschner, 1986) e ativada pelo Mo como cofator (Beevers & Hageman, 1969). Essa hipótese é suportada por Vieira (1994) que encontrou maior atividade da enzima com aplicação foliar de Mo. Resultados similares têm sido obtidos através da inoculação com *Azospirillum* sobre outras enzimas (Bashan & Levanony, 1990), demonstrando o papel direto ou indireto desta bactéria no metabolismo de N da planta hospedeira. A maior atividade da redutase do nitrato em folhas de trigo tem sido atribuída à redutase do nitrato da bactéria e vista como uma das explicações para o aumento de N em plantas inoculadas (Ferreira et al., 1987). Deste modo, além da fixação de N₂, o aumento na assimilação de nitrato contribuiu com N para a planta.

Tabela 16 - Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de genótipos de milho cultivados em solução nutritiva, inoculados e não inoculados com uma mistura de estirpes homólogas de *Azospirillum*, 20 dias após a emergência. Médias de três repetições.

Genótipos						
inoculação	CMS 13	CMS 36	BR 451	S. ELITE	CMS 51	Médias
Raízes						
..... $\mu\text{moles NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ raízes.....						
COM	0,092 b	0,132 b	0,230 b	0,555 a	0,014 b	0,169
SEM	0,156 a	0,098 a	0,304 a	0,063 a	0,224 a	0,205
Médias	0,124	0,116	0,267	0,309	0,119	
Parte Aérea						
..... $\mu\text{moles NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ folhas.....						
COM	1,277	1,167	1,884	2,219	1,161	1,541 A
SEM	0,199	0,477	0,597	1,012	0,328	0,523 B
Médias	0,738 c	0,822 c	1,240 a	1,616 a	0,744 c	

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula, e minúscula na linha, não diferente significativamente ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Adicionalmente, os dados mostram que um dos genótipos utilizados, a população sintético elite, que apresentou um nível de atividade superior a 2 vezes ao das demais, na ausência de inoculação, e maior resposta à presença da bactéria inoculada, possui alta capacidade produtiva sob estresse de N no campo, indicando ser esta medida enzimática uma ferramenta útil em seleção de variedades de milho visando maior eficiência no uso de nitrogênio e/ou fixação biológica de N₂.

5. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada, os resultados permitiram apresentar as seguintes conclusões:

- a) Diferentes bactérias diazotróficas com características distintas de *Azospirillum* spp. podem ser isoladas de gramíneas.
- b) Há predominância de diazotróficos antígenicamente similares à espécie de *Azospirillum lipoferum* em seiva de milho, indicando elevado grau de especificidade nestas interações associativas.
- c) A atividade da redutase do nitrato aumentou nas folhas de milho em função da inoculação com *Azospirillum* spp., independente dos genótipos.
- d) Observou-se elevada diversidade morfológica, serológica e bioquímica entre diazotróficos isolados.
- f) As populações de milho apresentaram respostas diferenciais à inoculação com *Azospirillum* spp. em relação ao acúmulo de nutrientes. A população CMS 36 pode ser explorada como fonte de genótipos superiores visando eficiência para fixação biológica de N₂.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M. H.; EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S. Examining serological of "Cowpea" rhizobia by te ELISA technique. **Archeology Microbiology**, v.130, p.281-287, 1981.
- ALBRECHT, S.L.; OKON, Y.; BURRIS, R. H. Effects of light and temperature on association between *Zea mays* and *Spirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v.60, p.528-531, 1977.
- AL-MALLAH, M.K.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. Formation of nodular structures on rice seedling by rhizobia. **Journal Experimental Botany**, v.40, p.473-478, 1989.
- BALANDREAU, J.P.; MILLIER, C.R.; DOMMERGUES, Y.R. Diurnal variations of nitrogenase activity in the field. **Applied Microbiology**, v.27, p.662-665, 1974.
- BALANDREAU, J.P.; MILLIER, C.R.; WEINHARD, P.; DUCERF, P.; DOMMERGUES, Y.R. Etude des variations e la fixation d azote dans une ulture de mais. **Academic Science**, v.282, p.1071-1074. 1976
- BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in infection of cereal with *Azospirillum spp.*, **Soil Biology Biochemistry**, v.12, p.433-440, 1980.

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology Fertilizer Soils**, v.4, p.37-40, 1987.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov., sp. nov., a root-associated nitrogen - fixing bacterium. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.36, n.1, p.86-93, 1986.
- BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. **Journal Applied Bacteriology**, v.53, p.399-403, 1983.
- BASHAN, Y; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.591-605, 1990.
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.20, p.495-522. 1969.
- BLISS, F.A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. **Plant and Soil**, v.152, p.71-79, 1993.
- BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, v 108, p.53-65, 1988.

- BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. . Effects of inoculation of *Azospirillum* spp. on the nitrogen assimilation of field grown wheat. **Plant and Soil**, v.95, p.109-121, 1986.
- BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L. de; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contribution and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p.195-209, 1995.
- BOONEKAMP, M. Monoclonal antibodies and immunological techniques to detect plant pathogens. In: **COST-88 WORKSHOP, 1.**, Wageningen, 1987. **Proceedings**. Wageningen: PUDOC, 1988. p 24-27.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A₁, A₃ and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. Immunology and Immunity. In: BROCK,T.; MADIGAN, M.T. **Biology of microorganisms**. Prentice: Hall International, 1988. p.428-473.
- BÜLOW, J.F.W. von. Plant influence in symbiotic nitrogen. In: DÖBEREINER, J. et al. (Ed.) **Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics**. New York: Plenum Press, 1978. p.75-94. (Basic Life Science, 10).

- BÜLOW, J.F.W. von; DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**, v.72, p.2389-2393, 1975.
- BUTZ, R.G.; LONG, R.C. L-malate as an essent component of the xylem fluid of corn seedling. **Plant Physiology**, v.64, p.684-689. 1979.
- CAMARGO, E.P.; LOPES, J.D. Anticorpos monoclonais. **Ciência e Cultura**, v.35, n.8, p.1062-1074, 1983.
- CLARK, .M. F. Immunosorbent assay in plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**, v.19, p.83-106, 1981.
- CLARK, R.B.; BROWN, J. Differencial mineral uptake by maize inbreds. **Communication Soil Science Plant Analysis**, v.5, p.213-227. 1974.
- COHEN, E.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I.; HENIS, Y. Increase in dry weight and total nitrogen in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen - fixing *Azospirillum* spp. **Plant Physiology**, v.66, p.746-749, 1980.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIN, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indol-3-acetic and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, p.2883-2887, 1998.

- DAZZO, F.B.; MILAM, J.R. Serological studies of *Spirillum lipoferum*. **Soil Crop Science Society Fla. Proceeding**, v.35, p.122, 1976.
- De BRUIJN, F.D.; JING, Y.; DAZZO, F.B. Potential and pitfalls of trying to extend symbiotic interaction of nitrogen-fixing organisms to presently non-nodulated plants, such as rice. **Plant and Soil**, v.174, p.225-240, 1995.
- De-POLLI, H.; BOHLOOL, B.B.; DÖBEREINER, J. Serological differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host-plant specificity groups. **Archives of Microbiology**, v.126, p.217-222, 1980.
- De-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.119-123, 1977.
- DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J. (Ed.) **Methods for evaluation biological nitrogen fixation**. Chichester,: John Wiley, 1980. p.535-555.
- DÖBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 4., Rio de Janeiro, 1987. **Proceedings**. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1989. p.103-108. (Developments in Plant and Soil Sciences, 35).
- DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, N. (Ed). **The procariotes: a handbook on the biology of bacteria**. Heidelberg: Springer Verlag, 1992. v.3, p.2236-2253.

- DÖBEREINER, J. Ten years of *Azospirillum*. In: KLINGMULLER, W. (Ed.). *Azospirillum* II: Genetics, Physiology, Ecology. Birkhauser: Basel, 1983. p.9-23. (Experientia supplementum, 43).
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, SPI: Itaguaí: EMBRAPA,CNPAB, 1995. 60p.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J.N. (Ed.). **Nitrogen fixation**. Pullman: Washington State University Press, 1976. p.518-538.
- DÖBEREINER, J.; De POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. In: STEWARD, W.D.P. (Ed). **Nitrogen Fixation**. New York, Academic Press: 1980. p.301-333.
- DÖBEREINER, J.; DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. **Revista de Economia Rural**, v.18, p.447-460, 1980.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants**. Madison: Springer Verlag, 1987.
- DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Azospirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**,v.22, p.1464-1473, 1976.

- DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (Ed.). **New Horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht. 1993. p.671-676.
- DOMMERGUES, Y.; BALANDREAU, J.; RINALDO, G.; WEINHARD, P. Non-symbiotic nitrogen fixation in the tropical rhizosphere of rice, maize and different tropical grasses. **Soil Biology and Biochemistry**, v.5, p.83-89, 1973.
- EARL, C.D.; AUSTUBEL, F.M. The genetic engineering of nitrogen fixation. **Nutrition Review**, v.41, p.1-6, 1983.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v.8, p.871-874, 1971.
- FALLIK, E.; OKON, Y.; EPSTEIN, E.; GOLDMAN, A.; FISCHER, M. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* - inoculated maize roots. **Soil Biology Biochemistry**, v.21, p.147-153, 1989.
- FAO. FERTILIZERS YEARBOOK - 1992., v.41, p.46, 1992.
- FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, v.4, p.47-53, 1987.

- FIGUEIREDO, M.B.; ALBA, A.P.C.; OLIVEIRA, A.R. Sorologia aplicada ao estudo dos fungos fitopatológicos. **Summa Phytopathologica**, v.3, p.233-259, 1977.
- FREITAS, J.L.M. de; ROCHA, R.E.M. da; PEREIRA, P.A.A.; DÖBEREINER, J. Matéria orgânica e inoculação com *Azospirillum* na incorporação de N pelo milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, p.1423-1432, 1982.
- GABELMAN, W. H.; GERLLOF, G.C. the search for and interpletation of genetic controls that enhance plant growth under deficiency levels of a macrontrient. **Plant and Soil**, v.72, p.335-350. 1983.
- GILLER, K.E.; DAY, J.; DART, P.J.; WANI, S.P. Method for measuring the transfer of fixed nitrogen from free-living bacteria to higher plants using $^{15}\text{N}_2$. **Journal Microbiology Methods**, v.2, p.307-316, 1984.
- GOEBEL, E.M.; KRIEG, N.R. Frtse catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, v.159, p.86-92. 1984.
- HAAHTELA, K.; WARTIOVAARA, T.; SUNDMAN, V.; SKUJINS, J. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Entero-bacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. **Applied Environment Microbiology**, v.41, p.203-206, 1981.
- HADAS, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration and tomato seedlings. **Biology Fertilizer Soils**, v.5, p.241-247.1987.

- HALK, E.L.; DeBOER, S.H. Monoclonal antibodies in plant-disease research. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.321-356, 1985.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEIN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene assay for N₂ fixation. Laboratory and field evaluation.. **Plant Physiology**, v.43, p.1185-1207, 1968.
- HARWOOD, R.R. A history of sustainable agriculture. In: EDWARDS, C.A.(Ed.). Sustainable Agricultural systems. Ankeny: Soil and Water Conservation Society of America 1990. p.3-19.
- HAWKSWORTH, D.L. The biodiversity of microorganisms and invertbrates: ts role in sustainable agriculture. Melkshan: CAB International , Redwood Press Ltd . 1991. 302 p.
- HEGAZI, N.A.; MONIB, M.; AMER, H.A.; SHOKR, E.S. Response of maize plants to inoculation with azospirilla and (or) straw amendment in Egypt. **Canadian Journal Microbiology**, v.29, p.888-889, 1983.
- HERRIDGE, D.F.; MARCELLOS, H.; FELTON, W.L.; PEOPLES, M.B. Legume N₂ fixation-an efficient source of N for cereal production. In: **Nuclear Related Methods in Soil/Plant Aspects of sustainble Agriculture**, FAO/IAEA, Viena. 1994.

- HOBEN, H.J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.5, p.1246-1247. 1982.
- HOLL, F.B. Plant genetics: manipulation of the host. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.945-953, 1983.
- HOREMANS, S.; DE CONINOK, K.; NEVRAY, J.; HERMANS, R.; VLASSAK, K. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria. **Symbiosis**, v.2, p.341-346, 1986.
- JORDAN, R.L. Strategy and techniques for the production of monoclonal antibodies; monoclonal antibody application for viruses. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; De BOER, S. (Ed.). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens**. St. Paul: APS Press, 1990. p.55-77.
- JORDAN, R.L.; HAMMOND, J. Epitope specificity of strain, virus, subgroup-specific and polyvirus group cross-reactive monoclonal antibodies. **Phytopathology**, v.78, p. , 1988.
- KAPULNIK, Y. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *T. turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v.4, p.27-35, 1987.

KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y.; HENIS, Y. The effect of *Azospirillum* inoculation on growth and yield of corn. **Israel Journal Botany**, v.31, p.247-256, 1982.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HEIS, Y. Changes in root morphology caused by *Azospirillum* inoculation. **Canadian journal of Microbiology**, v.31, p.881-887. 1985.

KENNEDY, A. C. ; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v.170, p.75-86, 1995.

KENNEDY, I.R.; TCHAN, Y.T. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops, recent advances. **Plant and Soil**, v.142, n.1/2, p.93-118, 1992.

KHAMMAS, K.M.; AGERON, G.; GRIMONT P.A.; KEISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacteria associated with rice roots and rhizospheric soil. **Research Microbiology**, v.140, p.679-693, 1989.

KISHINEVSKY, B.; BAR-JOSEPH, M. *Rhizobium* strain identification in *Arachis hypogaea* nodules y enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Canadian Journal Microbiology**, v.24, p.1537- 1543, 1978.

KISHINEVSKY, B.; GURFEL, D.; LOBEL, R.; NEMAS, C. Use of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) as a serological screening test in studies of peanut: *Rhizobium* strains. **Israel Journal of Botany**, v.31, p.119-130, 1982.

- KLOSSAK, R.M.; BOHLOOL, B.B. Prevalence of *Azospirillum* spp. in the rhizosphere of tropical grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.649-652, 1983.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of used cells secreting antibody δ predefined specificities. **Nature**, v.256, p.495-497, 1975.
- KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. The genus *Azospirillum*. In: HOLT, J.G.; KRIEG, N.R. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th edn.**. Baltimore: Willians & Willians, 1986. p.94-104.
- LADHA, J.K.; PAREEK, R.P.; BECKER, M. Stem-nodulating legume-Rhizobium symbiosis and its agronomic use in lowland rice. **Advanced Soil Science**, v.20, p.147-192, 1982.
- LAMM, R.B.; NEYRA, C.A. Characterization and cyst production of *Azospirilla* isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. **Canadian Journal of Microbiology**, v.27, p.1320-1325, 1981.
- LAZAROVITS, G. The dot immunobinding assay (DIA) - bacteria. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. (Ed). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens**. 1990. p.249-263.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y. Localization of specific antigens of *Azospirillum brasilense* Cd in its exopolysaccharide by immuno-gold staining. **Current Microbiology**, v.18, p.145-149, 1989.

LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; KAHANA, Z. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd in cereal roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.358-64, 1987.

LIMA, E.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using ^{15}N acid nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.165-170, 1987.

LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R.W. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Applied Environment Microbiology**. v.45, p.1775-1779, 1983.

MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Biologia**, v.39, p.587-596. 1979.

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**, v.55, p.417-430, 1983.

MAKAROVA, N.M.; CHUVAEVA, N.A.; KRAVCHENKO, L.V. Serological proprieties of *Azospirillum* strains. **Microbiology**, v.60, n.1, p.96-101, 1991

MARRIEL, I.E.; PACHECO, C.A.P.; PURCINO, A.A.C.; MAGALHÃES, J.R. Eficiência no uso de nitrogênio em populações de milho cultivadas sob estresse. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL. 4., Viçosa. **Resumos**. Viçosa: SBFV, 1991. P.37.

- MARRIEL, I.E.; SHAFFERT, R.E.; MORO, J.R.; PANTALEÃO, E.; FERRAZ, J.M.G. Aproveitamento de nitrogênio atmosférico em genótipos de milho, sorgo e milheto. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MILHO E SORGO, 12., Goiânia.1978. **Anais**. Goiânia: SBMS, 1978. p.42.
- MARSCHNER, H. Functions of mineral nutrition: micronutrients. In: MARSCHNER, H. (Ed.) **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. p.269-340.
- MARTENSON, A.M.; GUSTAFSSON, J.G.; LJUNGREN, H.D. A note on a highly sensitive modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Rhizobium meliloti* strain identification. **Journal General Microbiology**, v.130, p.103-109, 1984.
- MATTHEWS, S.W.; SCHANK, S.C.; ALDRICH, H.C.; SMITH, R.L. Peroxidase-antiperoxidase labeling of *Azospirillum brasilense* in field-grown pearl millet. **Soil Biology Biochemistry**. v.6, p.699-703, 1983.
- MERNAUG, R.; MERNAUG, G.; KOVACS, G. The immune response: Antigens, antibodies, antigen-antibody interactions. In: HAMPTON, R. ; BAU, E.; De BOER, S. (Ed).**Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens**.St. Paul: APS, 1990. p.3-15.
- MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; Von GOOL, A. *Azospirillum* plant root association: a review. **Biology and Fertility Soils**, v.8, p.356-368, 1989.

- MURTY, M.G.; LADHA, J.K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant and soil**, v.108, p.81-285. 1988.
- NEUMEIER, R. Monoklonale Antikörper in Biologie und Medizin . **Biologie in unserer Zeit**. v.14, n.4, p.97-102, 1984.
- NIELSEN, N.E.; BABER, S.A. Differences amongs genotypes of corn in the kinetics of P uptake. **Agronomy Journal**, v.70, p.695-698. 1978.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.223-228, 1985.
- OKON, Y.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. Factors affecting growth and nitroge fixation of *Spirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, v.127, p.1248-1254. 1976.
- OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**, v.90, p.3-18, 1986.
- OLIVEIRA, O.C. de, URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Burning cane:the long term effects. **Institute of the Sugar Journal**, v.96, p.272-275, 1994.
- OLSEN, P.E.; RICE, W.A.; STEMKE, G.; PAGE, W.J. Strain -specific serological techniques for the identification of *Rhizobium meliloti* in commercial alfalfa inoculants. **Canadian Journal Microbiology**, v.29, p.225-230, 1983.

PAPENDICK, R.I.; PARR, J.F. Soil quality-The key to a sustainable agriculture. **American Journal Alternative Agriculture**. v.7, p.272-275, 1992.

PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.900-915, 1983.

PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production ? **Plant and Soil**, v.174, p.3-28, 1995.

PHAFF, H . Microorganismos industriais. **American Scientific**, v.245, n.3, p.53-67, 1981.

REINHOLD, B.; HURCK, T.; FENDRIK, I. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. **Journal of bacteriology**, v.162, p.190-195. 1985.

REINHOLD, B.; HURCK, T.; FENDRIK, I.; GILLIS, M.; KERTSERS, K.; THIELEMANS, D.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov. a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass *Leptochloa fusca* (L. Kunth). **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.37, p.43-51, 1987.

ROLFE, V.G.; BENDER, G.L. Evolving a *Rhizobium* for non legume nodulation. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH; L.E.; STACEY G; NEWTON, V.E .Nitrogen fixation: achievements and objectives. New York: Chapman and Hall, 1990. p.

- SARIG, S.; BLUM, A.; OKON, Y. Improvement of the water status and yield of field grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Agriculture Science Camb.** v.110, p.271-277, 1988.
- SCHANK, S.C.; SMITH, R.L.; WEISER G.C.; ZUBERE, D.A.; BOUTON, J.R.; LITTELI, R. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. **Soil Biology Biochemistry**, v.11, p.287-295. 1979.
- SCHLOTTER, M.; BODE, W.; HARTMANN, A. Characterization of monoclonal antibodies against cell surface structures of *Azospirillum brasilense* Sp7 using ELISA techniques. **Symbiosis**, v.13, p.37-45, 1992.
- SCHLOTTER, M.; BROLINGHAUS, R.; BODE, W.; HARTMANN, A. Direct identification and localization of *Azospirillum* in the rhizosphere of wheat using fluorescence-labelled monoclonal antibodies and confocal scanning laser microscopy. **Journal of Microscopy**, v.171, n.2 p.173-177, 1993.
- SCHWARZ, K.U. ; GEISLER, G. A rapid screening method to describe genetic variability in root development of cereals. In: McMICHAEL, B. L.; PEARSON, H. (Ed.). **Plant roots and their environment**. Kiel: Elsevier Science Publishers B.V., 1991. p.632-647.
- SELDIN, L.; PENIDO, E.G.C. Identification of *Bacillus azotoficans* using API tests. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.52, p.403-409. 1986.

- SUZUKI, D.T. **Inventing the future: reflections on science, technology and nature.**, St Leonards: Allen and Unwin Pty. 1990. 247p.
- TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum lipoferum* gen. nov. and two species: *Azospirillum lipoferum* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.967-980, 1978.
- TANGLEY, L. Crop productivity revisited. **BioScience**, v.36, p.142-147, 1986.
- TCHAN, Y.T.; ZEMAN, A.M.M.; KENNEDY, I.R. Nitrogen fixation in paranodules of wheat roots by introduced free-living diazotrophs. **Plant and Soil**, v.137, p.43-47, 1991.
- TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBEL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Panicum americanum* L.). **Applied Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.
- TSUI, C. The role of zinc in auxin synthesis in the tomato plant. **American Journal Botany**, v.27, p.939-955. 1948.
- VELEZ, D.; MacMILLAN, J.D.; MILLER, L. Production and use of monoclonal antibodies for identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v.34, p.88-92, 1988.

VELEZ, D.; REUVENY, S.; MILLER, L.; MacMILLAN, J.D. Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. **Journal of Immunology Methods**, v.86, p.45-72, 1986.

VIEIRA, R. Aplicação foliar de molibdênio e seu efeito nas atividades de nitrogenase e redutase do nitrato no feijoeiro no campo. Piracicaba, 1994. 188p.(Tese) Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E. **Enzyme - linked immunosorbens assay (ELISA)**. In: ROSE, N.; FRIEDMAN, H.; FAHEY, L. (Ed.). **Manual of Clinical laboratory immunology**. Washington: American society for Microbiology, 1986. p.99-109.

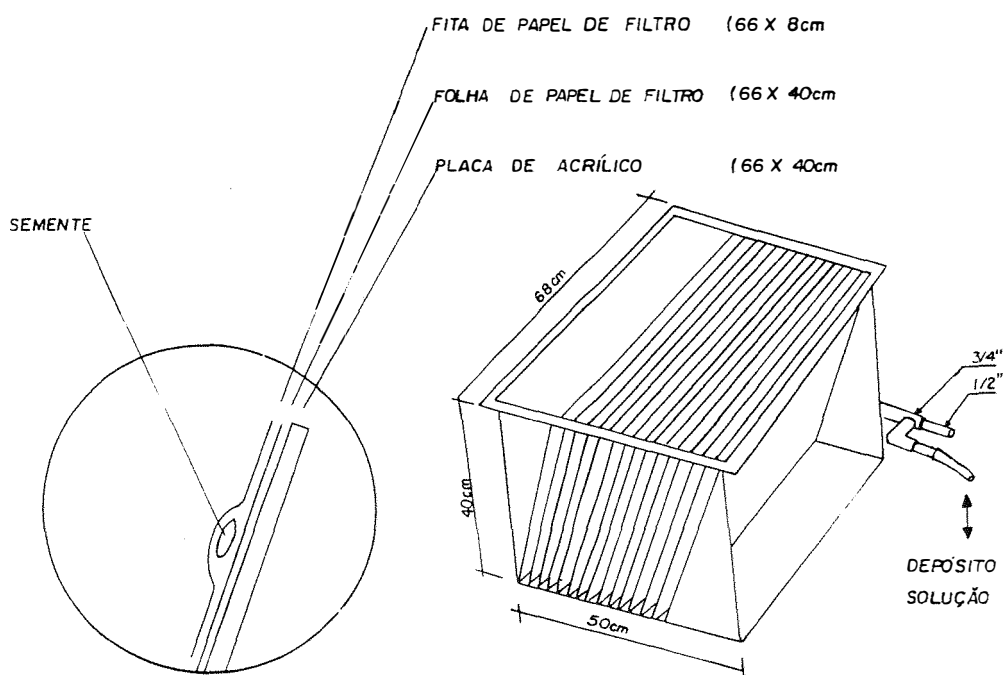
WATANABE, I.; YONEYAMA, T.; PADRE, B.; LADHA, J.K. Difference in natural abundance of ^{15}N in several rice (*Oriza sativum*, L.) varieties: applications for evaluating N_2 fixation. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.33, p.407-415, 1987.

WRIGHT, S.F.; FOSTER, J.G.; BENNET, O.L. Production and use of monoclonal antibodies for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.119-123, 1986.

YOSHIDA, T.; ANCAJAS, R.R. Nitrogen-fixing activity in upland and flooded rice fields. **Soil Science Society of American Proceeding**, v.37 p.42-46, 1973.

ZUBERER D.A.; ALEXANDER, D.B. Effects of oxygen partial pressure and combined nitrogen on N_2 fixation (C_2H_2) associated with *Zea mays* and other graminaceous species. **Plant and Soil**, v.90, p.47-58, 1986.

APÊNDICE



Apêndice 1 - Esquema ilustrativo do sistema usado para avaliação da morfologia do sistema radicular das plantas.

Apêndice 2 - Lista de alguns isolados de diazotróficos obtidos de origens diversas e identificados¹ utilizando-se parâmetros morfológicos e fisiológicos.

Isolado	Origem	Identificação
2	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND ²
12	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
13	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
13.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
13.2	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
14	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
15	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
15.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
18	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
20	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
20.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
22	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
22.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
22.2	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
23	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
28	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
28.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
29	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
29.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
30	Raiz lavada de milho. Sete Lagoas, MG	ND
30.1	Raiz lavada de milho. Sete Lagoas, MG	ND
31	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
31.1	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
33	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
33.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
34	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
36	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
37	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
38	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
38.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
42	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
42.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
43	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
43.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>

43.2	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
44	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
45	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
45.1	Raiz lavada de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
46	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
53	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
54	Raiz lavada de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
71	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
73	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
79	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
95	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
95.1	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
97	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
98	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
99	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
101	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
101.1	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
103	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
119	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
125	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
125.1	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
132	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
132.1	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
157	Grãos de milho, Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
157.1	Grãos de milho, Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
158	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
158.1	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
159	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
159.1	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
160	Estígma de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
161	Grãos de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
161.1	Grãos de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
162.1	Efluente de microdestilaria. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
163.1	Efluente de microdestilaria. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
164	Grãos de milho. Piracicaba, SP	<i>A. brasilense</i>
164.1	Grãos de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
165	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
166	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>

167	Estígma de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
168	Estígma de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
168.1	Estígma de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
170	Estígma de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
171	Seiva de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
172	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
173	Grãos de milho. São Carlos, SP	<i>A. lipoferum</i>
174	Seiva de milho. Piracicaba, SP	<i>A. brasilense</i>
175	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
175.1	Raiz lavada de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
176	Grãos de milho. Piracicaba, SP	<i>A. brasilense</i>
182	Seiva de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
186	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
187	Raiz esterilizada de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
192	Raiz esterilizada de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
194	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
195	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
196	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
200	SP7	<i>A. lipoferum</i>
213	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
215	Capim. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
215.1	Capim. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
216	Raiz de centeio. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
217	Seiva de milho. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
218	Capim coloniã. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
219	Raiz de sorgo. Piracicaba, SP	<i>A. lipoferum</i>
220	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
221	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
222	Capim coloniã. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
222.1	Capim coloniã. Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
223	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
224	Solo da rizosfera de milho, Sete Lagoas, MG *	<i>A. lipoferum</i>
224.1	Solo da rizosfera de milho, Sete Lagoas, MG	<i>A. lipoferum</i>
226	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	<i>A. brasilense</i>
227	Raiz de sorgo. Espírito Santo, ES	<i>A. lipoferum</i>
228	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND
229	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND

233	Seiva de milho. Piracicaba, SP	ND
234	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
235	Raiz lavada de milho. Sete Lagoas, MG	ND
236	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND
236.1	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND
237	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND
238	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND
239	Solo da rizosfera de milho, Sete Lagoas, MG	ND
240	Raiz de milho. Sete Lagoas, MG	ND
241	Raiz de centeio. Sete Lagoas, MG	ND
242	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
244	Lesões de semente de feijão. Sete Lagoas, MG	ND
246	Raiz de milho. Piracicaba, SP	ND
248	Solo da rizosfera de milho, Sete Lagoas, MG	ND
250	Raiz de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
251	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND
252	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND
253	Seiva de milho. Sete Lagoas, MG	ND
254	Grãos de milho. Piracicaba, SP	ND
255	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
256	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND
257	Raiz de milho. Sete Lagoas, MG	ND
259	Seiva de sorgo. Sete Lagoas, MG	ND

¹Identificação foi efetuada de acordo com os critérios recomendados por Döbereiner et al. (1995).

²ND - isolado não identificado.