

MATÉRIA ORGÂNICA E INOCULAÇÃO COM AZOSPIRILLUM NA INCORPORAÇÃO DE N PELO MILHO¹

JOSÉ LUIZ M. DE FREITAS², RICADO EIRAS M. DA ROCHA,
PEDRO ANTONIO A. PEREIRA³ e JOHANA DÖBEREINER⁴

RESUMO - Foi feito um experimento de campo num solo sem cultivo havia muitos anos, para estudo do efeito da inoculação com *Azospirillum* sp. na incorporação de N na planta e na produção de grãos. Foi estudada também a interação da matéria orgânica (composto de lixo) com a adubação nitrogenada. O efeito da inoculação com uma estirpe homóloga (isolada de raízes de milho (*Zea mays* L.)), foi altamente significativo no peso das plantas e no N total incorporado, enquanto a inoculação com a estirpe heteróloga (isolada de raízes de arroz (*Oryza sativa* L.)) não teve efeito. A diferença de N total na planta devido à inoculação com *Azospirillum* foi em torno de 40 kg/ha de N e não foi afetada pela aplicação de 60 kg/ha de N mineral. O efeito da inoculação foi igual ou maior que o causado pela aplicação de 60 kg/ha de N em forma de NH_4NO_3 . O efeito da inoculação na produção de grãos teve a mesma tendência, mas não foi significativo. Foram observados aumentos de produção na ordem de 25% (600 kg/ha), correspondendo a 12 kg/ha de N no grão; a adubação com N mineral proporcionou aumentos de produção de 1.000 kg/ha. Num experimento de vasos com o mesmo solo e os mesmos tratamentos foi verificado o estabelecimento preferencial da estirpe homóloga nas raízes de milho. Observações microscópicas indicam o estabelecimento da bactéria inoculada no xilema das raízes.

Termos para indexação: adubação nitrogenada, estirpe homóloga, estirpe heteróloga, produção de grão, *Zea mays*, *Oryza sativa*.

ORGANIC MATTER AND INOCULATION WITH AZOSPIRILLUM ON NITROGEN INCORPORATION BY FIELD GROWN MAIZE

ABSTRACT - A field trial using a soil which had not been cultivated for many years, was designed to show the effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on N incorporation and grain production by maize (*Zea mays* L.) plants. The organic matter and N fertilization interactions were also taken into consideration. The effect of inoculation with a homologous strain (isolated from maize roots) was highly significant for dry weight and total N in plants while inoculation with the heterologous strain (isolated from rice (*Oryza sativa* L.) roots) had no effect. The increase of total N in the inoculated plants was around 40 kg/ha of N and was not affected by the use of 60 kg/ha of N. Inoculated plants showed an equal or higher increase in total N when compared with the corresponding treatments that had received 60 kg/ha of N under the form of NH_4NO_3 . The effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on grain production showed the same trend but was not significant. A 25% increase (600 kg/ha), corresponding to 12 kg/ha of N in grain was observed in the inoculated plants as compared to 1,000 kg/ha in the N fertilized plants. An experiment using pots with the same soil and same treatments showed the preferential establishment of the homologous strain in the roots. Microscopic observations at grain filling stage indicated root xylem infection with TTC reducing bacteria in the inoculated plants.

Index terms: nitrogen fertilization, homologous strain, heterologous strain, grain production, *Zea mays*, *Oryza sativa*.

INTRODUÇÃO

A produção de milho no Brasil tem sido limitada, nos últimos anos, pelos insumos cada vez mais

onerosos, e especialmente pelos aumentos nos preços de fertilizantes nitrogenados. Na procura de alternativas, o fornecimento de nitrogênio por fontes biológicas está ganhando cada vez mais importância. O uso do composto do lixo, normalmente mais recomendado para culturas pequenas e principalmente hortaliças, pode ganhar em importância como condicionador do solo, que aumenta a retenção de água, a aeração e principalmente a atividade microbiológica do solo. Esta, por sua vez, interfere na eficiência dos adubos nitrogenados, de um lado, e num possível aumento da fixação biológica do

¹ Aceito para publicação em 19 de maio de 1982.

² Bolsista do Programa de Fixação Biológica de Nitrogênio - Convênio EMBRAPA/CNPq.

³ Eng.^o Agr.^o, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP) - EMBRAPA, CEP 74000 - Goiânia, GO.

⁴ Eng.^o Agr.^o, Ph.D., Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (SNLCS) - EMBRAPA, CEP 23460 - Seropédica, RJ.

nitrogênio atmosférico, do outro.

Foi descrita a associação de *Azospirillum* com milho (Bülow & Döbereiner 1975), que consiste numa associação ainda não bem definida de bactérias fixadoras de N_2 com as raízes do milho e de várias outras gramíneas (Döbereiner & Day 1976, Neyra & Döbereiner 1977, Döbereiner & De-Polli 1980a e Boddey & Döbereiner 1982). O milho pode ser infectado pelas bactérias, que se multiplicam em espaços inter e intra-celulares do córtex e do cilindro central (Patriquin & Döbereiner 1978, Magalhães et al. 1979, Döbereiner & De-Polli 1980b). A infecção do cilindro central e, ocasionalmente, dos colmos, foi mais intensa durante a época de reprodução do milho (Magalhães et al. 1979, Scott et al. 1978), justamente quando foi observado o maior pico da atividade da nitrogenase em raízes (Balandreau 1975, Bülow & Döbereiner 1975). Variação da fixação de nitrogênio com o ciclo da planta foi observada também em arroz (Watanabe et al. 1978), trigo (Nery et al. 1977), sorgo (Berkum 1978) e milheto (Dart 1978).

A comunicação da existência da fixação de nitrogênio no milho (Bülow & Döbereiner 1975) deu origem a um grande número de experimentos de inoculação com *Azospirillum* spp (Burris et al. 1978, Smith et al. 1976, Bouton et al. 1979, Bouton & Zuberer 1979, Rao 1981), sem que se tenham ainda informações sobre a natureza específica da associação e a possível existência de especificidade hospedeira. Nos EUA, onde foi utilizada a estirpe padrão Sp 7 (ATCC 29145) de *Azospirillum brasilense*, altamente isolada de solos sob *Digitaria*, no Brasil, observaram-se efeitos significativos na ordem de 15 kg/ha de N, às vezes positivos, às vezes negativos (Döbereiner 1978) e que dependiam da disponibilidade do nitrogênio no solo. Uma correlação negativa e altamente significativa entre a resposta à inoculação e o N disponível no solo confirmou isto. Na Índia, onde foram usadas estirpes de *Azospirillum* isoladas das espécies vegetais para as quais foram usadas (Rao 1981) houve efeitos significativos e positivos em experimentos de campo. Recentemente, foram obtidos dados mais promissores em Israel (Nur et al. 1980a, b) onde os solos não possuem *Azospirillum*.

Os problemas da inoculação de plantas com bactérias fixadoras de N_2 foram detalhadamente discutidos em outro trabalho (Döbereiner & Baldani 1981), onde se alertou para a necessidade de conhecimentos mais precisos sobre a presença de bactérias autóctones no solo e sobre a competição entre as bactérias acrescentadas pela inoculação e a grande maioria de outros microorganismos existentes no solo e em estado de equilíbrio entre si. Mesmo na bem estabelecida simbiose das leguminosas, se não for altamente específica, apenas uma pequena fração (5%) dos nódulos são formados pela estirpe de *Rhizobium* inoculada (Date 1973). Com a presença abundante de *Azospirillum* spp em solos sob milho, no Brasil (Döbereiner et al. 1976, Magalhães et al. 1979), não parecia haver muitas possibilidades para aumentos substanciais da fixação de N_2 em cereais com a inoculação de *Azospirillum* spp.

Estudos durante os últimos anos revelaram, entretanto, uma série de fatos novos que interferem nas associações diazotróficas de cereais: a presença, em nossos solos de pelo menos duas espécies de *Azospirillum*, o que levou à necessidade de uma reclassificação (Tarrand et al. (1978). Foram encontradas formas denitrificantes (nir^+) e não-denitrificantes (nir^-) nas duas espécies (Neyra et al. 1977, Baldani & Döbereiner 1980). A fixação de N_2 , de um lado, e a denitrificação, de outro, por bactérias presentes na rizosfera em números muito altos como os encontrados (Magalhães et al. 1979), nos solos sob cultura de cereais e gramíneas forrageiras (Nery et al. 1977), podem interferir na disponibilidade de nitrogênio para as culturas, podendo tanto levar a perdas como a ganhos substanciais. Revelou-se, ainda, certa especificidade hospedeira, sendo que as estirpes de *Azospirillum* isoladas de plantas com via fotossintética C_4 (a maioria dos cereais e gramíneas tropicais) foram identificadas como *A. lipoferum*, e as das plantas C_3 , como *A. brasilense* (Baldani & Döbereiner 1980, Baldani et al. 1981). Em ambos os casos, as formas não-denitrificantes prevalecem nas raízes, enquanto que no solo, as formas denitrificantes são mais comuns.

No presente trabalho são apresentados os primeiros resultados promissores da inoculação de

Azospirillum no Brasil, comparada com a aplicação de matéria orgânica e com a adubação nitrogenada.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram feitos dois experimentos, um de campo e um de vasos, com o mesmo solo e tratamentos.

O experimento de vasos visou estudar o estabelecimento das bactérias inoculadas. O esquema experimental foi um fatorial 2 x 2 x 3, com quatro repetições. Os tratamentos foram os seguintes:

1. Com e sem matéria orgânica (M.O.).
2. Baixa e média adubação nitrogenada (20 e 80 kg/ha de N).
3. Três tratamentos de inoculação: um, uma estirpe isolada de raízes esterilizadas de milho (Sp 242); outro, uma estirpe isolada de raízes esterilizadas de arroz (Sp 109); e o terceiro, a testemunha, sem inoculação.

O experimento de campo foi plantado num solo de transição entre as séries Itaguaí (Podzólico Vermelho-Amarelo) e Ecologia (gray hidromórfico), com a seguinte análise: Ca⁺⁺ 3,3; Mg⁺⁺ 0,8 mE/100 ml; K⁺ 38,0; Al⁺⁺⁺ 0,0; e P 7,0 ppm. O pH foi 6,5.

No histórico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Departamento Nacional de Pesquisa e Experimentação Agropecuárias (DNPEA), durante muitos anos, não houve plantios nesta área, que ficou coberta com capim-colonião. As parcelas eram de 6 m x 6 m e continham seis linhas com cinco plantas por m linear (50.000 plantas/ha). Foi aplicada uma adubação básica de P (68,6 kg/ha), K (132,7 kg/ha), micronutrientes na forma de FTE-Br 16 (40 kg/ha) e calcário (1,5 t/ha), 16 dias antes do plantio. A cultivar de milho foi a Sintético. Todos os tratamentos receberam cobertura de 20 kg/ha de N em forma de salitre na germinação. Nos tratamentos com adubação nitrogenada foi dada mais uma cobertura de 60 kg/ha dez dias antes da floração. O plantio foi no dia 7.10.1979, a primeira colheita no dia 21.2.80 e a colheita de grãos, no dia 25.3.80.

A matéria orgânica foi aplicada em forma de composto de lixo comercializado pela COMLURB, Rio de Janeiro, na base de 40 t/ha, distribuída uniformemente, nas devidas parcelas. A composição em percentagem deste composto foi a seguinte: N - 0,8; C - 8,4; P₂O₅ total - 0,63; P₂O₅ solúvel em ac. cítrico - 0,3 e P₂O₅ solúvel em H₂O - 0,004.

Como inoculantes, foram usadas uma estirpe de *Azospirillum* (Sp 242), isolada de raízes de milho cultivado no campo, estas esterilizadas durante 30 minutos com cloramina T (1%); e uma de *Azospirillum* (Sp 109), isolada de raízes de arroz, estas esterilizadas durante 15 minutos com cloramina T (1%). Foram selecionadas mutantes espontâneas resistentes à estreptomicina, através da inoculação densa de ágar-batata (Baldani & Dobereiner 1980) contendo 100 µg/ml de estreptomicina e isolamento de

mutantes resistentes. Estas foram retestadas em relação a fixação de N₂ e outras características de *Azospirillum*, sendo que a estirpe Sp 242st não mostrou crescimento em glucose e manitol como a estirpe selvagem, característica observada repetidamente na obtenção de mutantes de *Azospirillum lipoferum* resistentes a estreptomicina (Baldani 1980). A mutante 109st pareceu idêntica à estirpe selvagem. A inoculação foi feita pela aplicação, durante o plantio, de 50 ml/m (10 ml/planta) de *Azospirillum* cultivado em meio NFb acrescido de 1 g/litro de NH₄Cl. O conteúdo de N nos 10 ml de inoculante aplicado em cada planta correspondeu a apenas 3 mg de N e portanto foi desprezado nos cálculos de incorporação de N. O número de células aplicado por planta foi aproximadamente 10⁸. As testemunhas não receberam inoculante. Durante a época da floração foram colhidas quatro plantas de cada parcela, para determinação da acumulação de N na planta. Nesta época, raízes de todos os tratamentos foram incubados durante 24 h em solução de TTC (0,15%), em tampão fosfato 0.5 M pH 7.0 e depois cortados em creosato, montados em glicerol e observados no microscópio ótico (lente 25 X). A produção do milho foi extrapolada da colheita de grão seco ao ar das duas fileiras centrais (60 plantas/parcela).

No experimento de vasos foram usados baldes plásticos, com 10 kg de solo; e cada vaso continha inicialmente duas plantas, e foi retirada uma delas treze dias após a germinação. O solo e todos os tratamentos foram idênticos aos do experimento de campo. A ocorrência de *Azospirillum* spp no solo e em raízes esterilizadas (30 minutos em cloramina T a 1%) foi avaliada através da atividade de nitrogenase na fase log (42 horas de incubação) em culturas de enriquecimento para *Azospirillum* com e sem estreptomicina (100 µg/ml) (Magalhães et al. 1979, Scott et al. 1978).

A matéria seca da parte aérea da planta foi determinada após secagem a 70°C até peso constante, separadamente em colmos, folhas e espigas. O material foi moído e homogeneizado e analisado pelo método micro Kjeldahl para o teor de N total.

RESULTADOS

Como o objetivo principal do experimento foi obter informações sobre o efeito dos tratamentos na incorporação de N pela planta, foi feita uma colheita das plantas inteiras (parte aérea) no estádio de emissão do pendão. Os resultados desta colheita mostraram as diferenças mais pronunciadas (Tabela 1). Os maiores aumentos na assimilação de N, como também na massa seca, foram obtidos com a aplicação do composto do lixo (M.O.) e este efeito superou mesmo a aplicação de 60 kg/ha de N. Todavia, nas parcelas sem M.O. o efeito do

TABELA 1. Efeito da inoculação com *Azospirillum* e da matéria orgânica na incorporação de N pelo milho cultivado no campo (época da floração).

Tratamento ^b	Inoculante de <i>Azospirillum</i> ^c Estirpe-origem	Peso seco g/planta ^{ad}	N total na planta				
			g/planta ^{ad}	kg/ha ^e	kg/ha acrescentado pela inoculação	kg/ha acrescentado pela adubação mineral	kg/ha acrescentado pela matéria orgânica
Matéria orgânica + N	Sp 242st milho	202	3,05	152	37	28	1
	Sp 109st arroz	208	3,28	164	48	18	38
	Testemunha	159	2,31	115	-	26	6
Matéria orgânica	Sp 242st milho	247	3,56	178	36	-	63
	Sp 109st arroz	214	2,93	146	5	-	57
	Testemunha	193	2,83	141	-	-	70
N	Sp 242st milho	208	3,06	153	44	38	-
	Sp 109st arroz	168	2,52	126	17	37	-
	Testemunha	149	2,18	109	-	38	-
O	Sp 242 st milho	163	2,31	115	44	-	-
	Sp 109st arroz	129	1,78	89	17	-	-
	Testemunha	103	1,43	71	-	-	-

a Os efeitos da matéria orgânica e da inoculação e ainda a interação da matéria orgânica com adubação mineral foram significativos ($p = 0.01$).

b 40 t de composto de lixo/ha e de 60 kg/ha de N aplicado dez dias antes da floração na forma de NH_4NO_3 .

c Inoculação com 20 ml/cova de cultura crescida em NFB com 1 g/l de NH_4Cl . O N aplicado no inóculo corresponde a 3 mg/planta e portanto não foi computado.

d Médias de quatro parcelas e de quatro plantas em cada parcela.

e Baseado em 50.000 plantas/ha.

N também foi altamente significativo (interação), mostrando este elemento como fator limitante do desenvolvimento do milho, no presente experimento. A aplicação de 40 t/ha do composto com 0.8% N corresponde a 320 kg/ha de N; e os 57-70 kg/ha de N, incorporados graças à aplicação da M.O. (Tabela 1), representam uma eficiência de 18-22% no uso do N. Os aumentos de 37 a 39 kg/ha de N na planta com aplicação de 60 kg/ha de N na forma de NH_4NO_3 mostraram haver melhor eficiência no uso do fertilizante (mais que 60%).

Surpreendente e muito importante foi o aumento de 37 a 44 kg/ha de N causado pela inoculação com a estirpe de *Azospirillum* Sp 242st, principalmente porque este aumento também foi observado na presença da adubação nitrogenada. Com exceção do primeiro tratamento (com M.O. e adubação nitrogenada), o efeito da inoculação com a estirpe Sp 109st (isolada de arroz) foi muito menor.

A especificidade hospedeira descrita antes (Baldani & Dobereiner 1980) é confirmada com estas observações, como já o foi pelos aumentos do N total em trigo com a inoculação de *A. brasilense* (nir⁻) (Baldani 1980). Nesse como no presente trabalho, a estirpe de *Azospirillum* isolada da mesma planta proporcionou efeitos significativos na assimilação do N pela planta, enquanto as estirpes heterólogas não tiveram efeito.

A importância econômica da fixação de N_2 em associação com cereais tem sido colocada em dúvida porque se pensou que, mesmo que pequenas quantidades de N possam ser fixadas biologicamente, estas seriam insuficientes para elevadas produções, e complementação com adubação nitrogenada eliminaria a fixação de N_2 .

Os dados deste experimento, entretanto, indicam que será possível complementar dosagens baixas ou médias de N (80 kg/ha de N) pela fixação biológica, já que o aumento causado pela inoculação foi de 36 ou 44 kg/ha de N, independentemente da adubação com N. E enquanto a adubação nitrogenada junto com a M.O. não teve efeito, a inoculação ainda aumentou a incorporação de N. Sem M.O., o efeito da inoculação foi superior ao da cobertura com 60 kg/ha de N.

Os efeitos ora citados também se refletiram na produção (Tabela 2), mesmo que nesta o efeito da

inoculação não tenha sido significativo. Os efeitos mais pronunciados na produção foram da adubação mineral, mas os da matéria orgânica também foram significativos ($p = 0.01$). As produções foram boas e a inoculação com *Azospirillum* de milho proporcionou aumentos na ordem de 25% (até 570 kg/ha), enquanto a adubação nitrogenada de 60 kg/ha o aumento foi da ordem de 42% (até 1.000 kg/ha).

Uma tentativa de avaliar o estabelecimento das duas estirpes de *Azospirillum* inoculadas, foi feita através de avaliação da atividade de nitrogenase na fase logarítmica de cultivos de enriquecimento com e sem estreptomicina. Como as duas estirpes usadas foram resistentes a 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, estas medidas, além de dar valores aproximados da incidência de *Azospirillum* em raízes esterilizadas, ainda permitem estimativas aproximadas da percentagem da população resistente, isto é, proveniente do inoculante. Os dados na Tabela 3 mostram realmente uma incidência de *Azospirillum* maior nas raízes de plantas inoculadas com a estirpe Sp 242st. O efeito da inoculação aparece ainda mais pronunciado na percentagem de organismos provenientes do inoculante (resistente a 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina), indicando a substituição do *Azospirillum* do solo pelo inoculado, já que nas testemunhas não apareceu *Azospirillum* resistente à estreptomicina. Com exceção do tratamento sem M.O. e sem N, a inoculação com a estirpe Sp 242st, isolada de milho, parece substituir a flora autóctone praticamente por completo. Já a inoculação com *Azospirillum* de arroz mostrou menor estabelecimento.

As observações microscópicas de raízes colhidas na floração e tratadas com TTC são exemplificadas nas Fig. 1 e 2. Observam-se bactérias redutoras de TTC em células corticais (Fig. 1A), no metaxilema (Fig. 1B, C e D) e mais caracteristicamente nos vasos de protoxilema (Fig. 2A a E). As infecções do metaxilema - que mostram colônias e células individuais (Fig. 1B) - e principalmente do protoxilema, que resultou no entupimento quase completo, por longas extensões, dos vasos primários com bactérias, foram observados predominantemente nas plantas inoculadas com *Azospirillum* Sp 242st, sendo raras nas parcelas-testemu-

TABELA 2. Efeitos da inoculação com *Azospirillum* e da matéria orgânica na produção de grãos de milho no campo.

Tratamento	Inoculante de <i>Azospirillum</i> ^b Estirpe-origem	Produção de grãos kg/ha ^a	N total de grãos			
			kg/ha ^a	Acréscimo devido à inoculação kg/ha	Acréscimo devido à adubação com N kg/ha	Acréscimo devido à matéria orgânica kg/ha
Matéria orgânica + N	Sp 242st milho	3420	60,27	1,76	10,82	3,65
	Sp 109st arroz	3390	52,87	4,36	16,29	11,43
	Testemunha	3370	48,53	-	11,56	11,43
Matéria orgânica	Sp 242st milho	2630	39,45	2,48	-	2,07
	Sp 109st arroz	2540	36,58	- 0,39	-	11,38
	Testemunha	2370	36,97	-	-	7,80
N	Sp 242st milho	3150	46,62	11,53	9,24	-
	Sp 109st arroz	2960	41,33	6,35	16,24	-
	Testemunha	2580	35,09	-	5,92	-
O	Sp 242st milho	2560	37,38	12,18	-	-
	Sp 109st arroz	1750	25,20	- 3,97	-	-
	Testemunha	2040	29,17	-	-	-

^a Os dados foram obtidos pela extrapolação de 60 para 50.000 plantas/ha. Os efeitos da matéria orgânica e da adubação nitrogenada foram significativos ($p=0,01$); o da inoculação não atingiu o nível de significância a $p=0,05$, o C.V. foi 23,3% (N total no grão) e 20,9% na produção.

^b Inoculação com 20 ml/cova de cultura crescida em NFb com 1 g/l de NH_4Cl . O N aplicado no inóculo corresponde a 3 mg/planta e portanto não foi computado.

TABELA 3. Estabelecimento do *Azospirillum* resistente à estreptomicina (100 ppm) inoculado nas raízes de milho cultivado em vasos.

Tratamento	Inoculante de <i>Azospirillum</i> ^b Estirpe-origem	Atividade da nitrogenase em culturas de enriquecimento de <i>Azospirillum</i> ^a nmoles C_2H_4 /cultura/h		
		0	100 $\mu\text{g/ml}$ ^c	% resistente
Matéria orgânica + N	Sp 242st	25,2	21,7	86
	Sp 109st	12,1	2,3	19
	Testemunha	14,0	0	0
Matéria orgânica	Sp 242st	14,3	12,4	87
	Sp 109st	8,6	5,3	62
	Testemunha	5,2	0	0
N	Sp 242st	43,2	46,0	106
	Sp 109st	15,8	7,2	46
	Testemunha	3,8	0	0
O	Sp 242st	6,6	2,5	38
	Sp 109st	3,7	0,5	14
	Testemunha	0,9	0	0

^a Avaliação na fase logarítmica (42 h de incubação) com raízes esterilizadas. Médias de duas culturas, cada uma de três vasos.

^b Inoculação com 20 ml/cova de cultura crescida em NFb com 1 g/l de NH_4Cl . O N aplicado no inóculo corresponde a 3 mg/planta e portanto não foi computado.

^c 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina no meio de cultura.

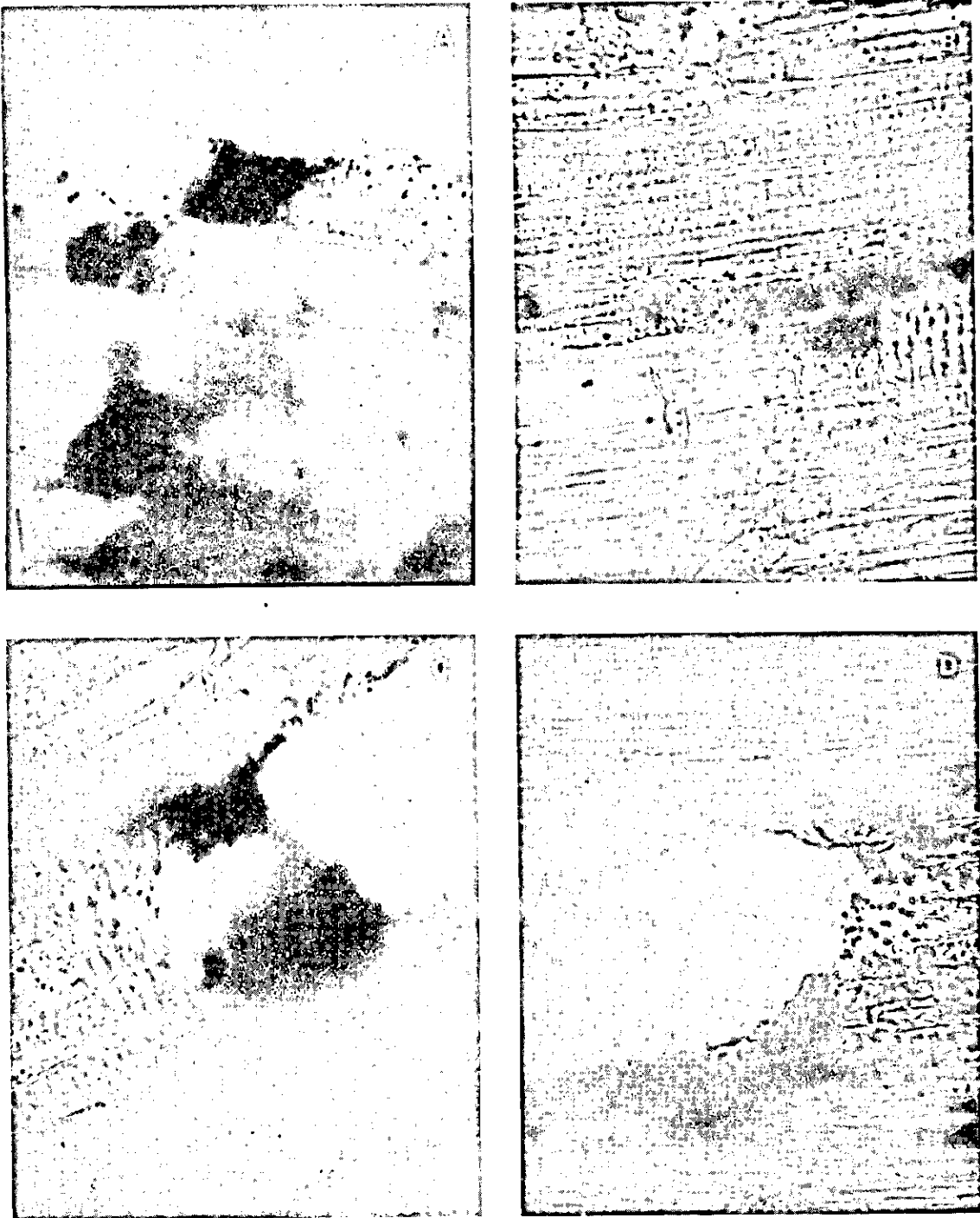


FIG. 1. Infecção do córtex e do cilindro central de milho cultivado no campo e inoculado com *Azospirillum* Sp 242st. Células do córtex inferior (A) e vasos do metaxilema mostrando colônias de bactérias redutoras de TTC (x250).

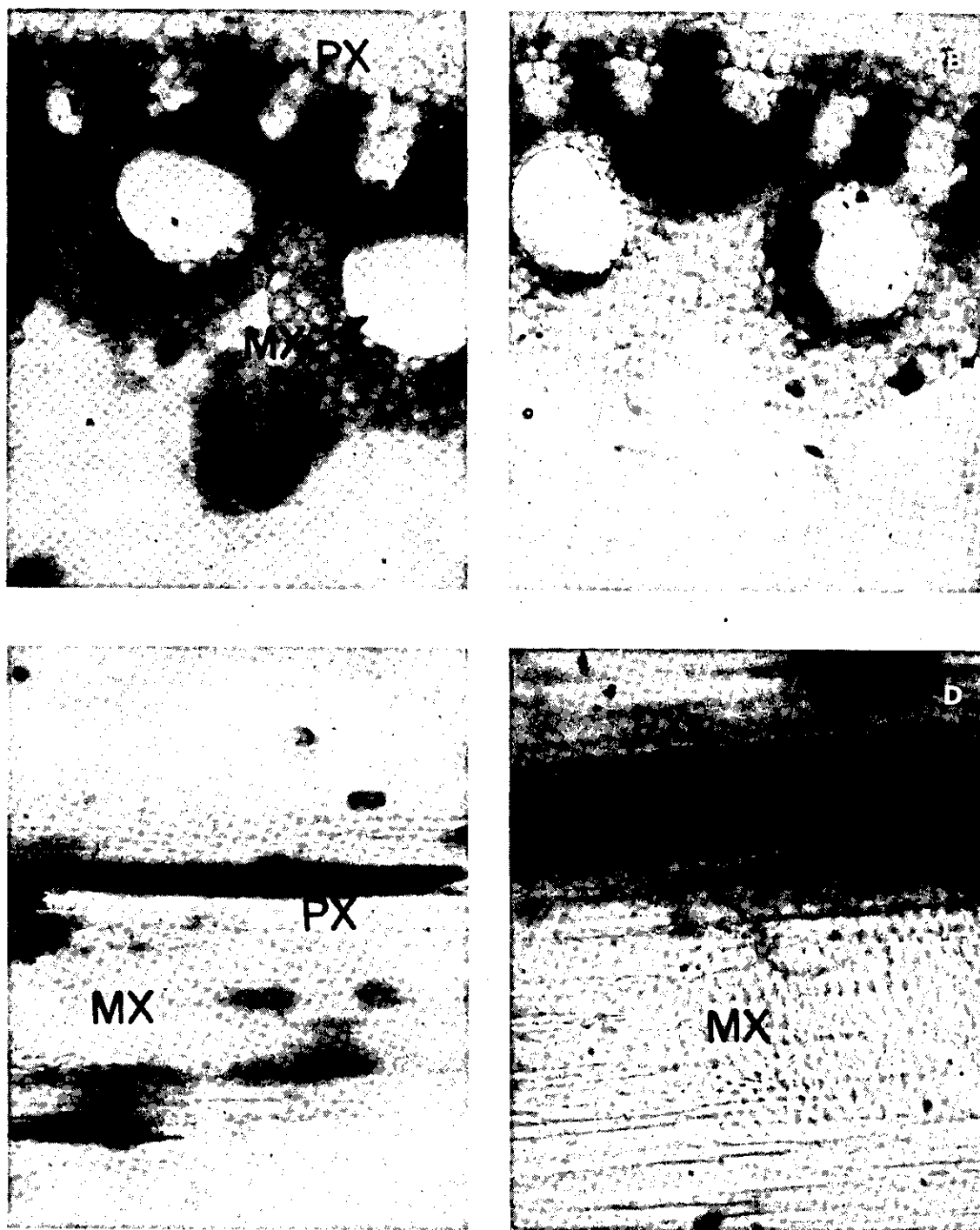


FIG. 2. Infecção caracterfstica com bactérias redutoras de TTC de vasos primários do protoxilema em corte transversal (A e B) e com corte longitudinal (C e D). PX - protoxilema, MX - metaxilema e PH - phloema, A, B, C x 250 e D x 400.

nhas e nas inoculadas com Sp 109st. Tentativas de repetir estas observações com valores quantitativos na época da maturação fracassaram, porque não foram mais observadas infecções radiculares nem nas parcelas testemunhas nem nas inoculadas com a estirpe Sp 242st.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho representam evidência direta das possibilidades de uso de inoculantes contendo *Azospirillum* sp. Baldani (1980) mostrou aumento significativo ($P < 0,05$) da incorporação de N pelo trigo cultivado em campo com a inoculação de *A. brasilense nir* (Sp 107st) isolada de trigo, que corresponde a 44 kg/ha de N, aumento este que não ocorreu com inoculação de *Azospirillum* isolado de milho. Já que está documentada a especificidade hospedeira na infecção de cereais e gramíneas forrageiras com *Azospirillum* spp (Baldani & Döbereiner 1980, Döbereiner 1979) e ainda parece haver vantagens para estirpes resistentes à estreptomina na competição na rizosfera (Döbereiner & Baldani 1981), o uso de estirpes homólogas e resistentes à estreptomina deve representar o primeiro passo para o sucesso da inoculação. No presente caso, o uso de um solo que não estava sob cultura havia muitos anos, deve ter ainda ajudado. O experimento de trigo citado (Baldani 1980) também foi feito numa área onde nunca antes tinha sido plantado trigo.

O método usado neste trabalho, apesar de medir diretamente o ganho em N incorporado nas plantas graças à inoculação, não dá prova de que este aumento realmente se deve à fixação de N_2 . Parece possível um efeito da bactéria no processo de assimilação de N do solo, como, por exemplo, redução de NO_3 a NO_2 , redução esta que ocorre muito rapidamente em culturas das duas espécies de *Azospirillum* (Neyra & Berkum 1977).

Os dados na Tabela 1 indicam efeito maior da inoculação quando aplicado junto com outra fonte de N no caso da estirpe Sp 242st que mais contribuiu com aumentos de N na planta.

As observações preliminares do aumento da infecção do cilindro central nas plantas inocula-

das com a estirpe Sp 242st abrem um campo extremamente interessante. Patriquin & Döbereiner (1978) e Magalhães et al. (1979) já observaram bactérias que são redutoras de TTC no xilema de milho e cuja incidência aumentou muito durante a época da floração, quando também se observa o pico da fixação de N_2 (Bülow & Döbereiner 1975). Mesmo que a reação da redução do TTC não seja específica para bactérias fixadoras de N_2 , ela tem sido usada para identificar sítios de fixação de N_2 (Patriquin & Döbereiner 1978), porque indica pontos de atividade fortemente redutora. O efeito da inoculação com uma estirpe específica de *Azospirillum* (Sp 242st) na infecção de certos vasos, principalmente os protoxilemas, permite levantar a hipótese de que o *Azospirillum* se instala nos vasos primários, iniciando rápida multiplicação durante o período reprodutivo do milho, quando se observa fixação de N_2 . Aglomeradas nestes vasos, as bactérias encontrariam alimentação proveniente da planta (a seiva de milho contém 0.05% de malato) e proteção contra o O_2 do ar. A ocorrência destas bactérias no xilema durante a época da floração e não em fase adiantada de maturação elimina a hipótese de infecções secundárias de raízes em decomposição.

Os resultados destes experimentos, apesar de promissores, não devem levar a conclusões precipitadas, já que ainda precisam ser confirmados em outros solos e os métodos de inoculação precisam ser aprimorados.

REFERÊNCIAS

- BALANDREAU, J. Activité nitrogénasique dans la rhizosphere de quelques graminées. L'Univ. Nancy, 1975. Tese Doutorado.
- BALDANI, J.I.; PEREIRA, P.A.A.; ROCHA, R.E.M. da. & DÖBEREINER, J. Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp. em plantas com via fotossintética C_3 e C_4 . Pesq. agropec. bras., 16:325-30, 1981.
- BALDANI, V.L.D. Especificidade na infecção de raízes de milho, trigo e arroz por *Azospirillum* spp. UFRRJ, 1980. 116p. Tese Mestrado.
- BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil. Biol. Biochem., 12:433-40, 1980.
- BERKUM, P.B.W. von. Nitrogenase activity associated with tropical grass root and some effects of combined nitrogen on *Spirillum lipoferum* Beijerinck.

- Univ. of London, 1978. 184p. Tese Doutorado.
- BODDEY, R.M. & DOBEREINER, J. Associations of *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical gramineae. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 2, New Delhi, India, Non-symbiotic nitrogen fixation and organic matter in the tropics. 1982. p.28-47.
- BOUTON, J.H.; SMITH, R.L.; SCHANK, S.C.; BURTON, G.W.; TYLER, M.E.; LITTELL, R.C.; GALLAHER, R.N. & QUESENBERRY, K.H. Response of pearl millet inbreds and hybrids to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Crop Sci.*, 19:12-6, 1979.
- BOUTON, J.H. & ZUBERER, D.A. Response of *Panicum maximum* Jacq. to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil*, 52:585-90, 1979.
- BULOW, J.F.W. von & DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72:2389-93, 1975.
- BURRIS, R.H.; ALBRECHT, S.L. & OKON, Y. Fisiology and biochemistry of *Spirillum lipoferum*. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, A.; HOLLANDER, A.; FRANCO, A.A.; NEYRA, C.A. & SCOTT, D.B. Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York, Plenum Press, 1978. p.303-15.
- DART, P.J. The ICRISAT microbiology programme. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Vienna, Austria. Proc. isotopes in biological dinitrogen fixation. Vienna. 1978. p.257-68.
- DATE, R.A. Nitrogen, a major limitation in the productivity of natural communities, crop and pastures in the pacific area. *Soil Biol. Biochem.*, 5:5-18, 1973.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas tropicais. *Interciência*, 4:200-5, 1979.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grass-bacteria associations in the tropics. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Vienna, Áustria. Isotopes in biological dinitrogen fixation. Vienna. 1978. p.51-69.
- DÖBEREINER, J. & BALDANI, V.L.D. Prospects for inoculation of grasses with *Azospirillum* spp. In: VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., ed. Associate N₂ fixation. Palm Beach, Florida, CRC Press Inc., 1981. p.1-9.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J., ed. Intern. symp. on N₂ fixation. Washington State Univ., 1976. p.518-38.
- DÖBEREINER, J. & DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. In: STEWART, W.D.P. & GALLON, R.J., ed. Nitrogen fixation. London, New York, Academic Press, 1980a. p.301-33.
- DÖBEREINER, J. & DE-POLLI, H. Nitrogen fixation in rhizocoenoses. In: INTERN. SYMP. ON ROOT/SOIL SYST. Londrina, 1980b.
- DÖBEREINER, J.; NERY, M. & MARRIEL, I.E. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.*, 22:1464-73, 1976.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D. & DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Rev. Brasil. Biol.*, 39:587-96, 1979.
- NERY, M.; ABRANTES, G.T.V.; SANTOS, O. de & DOBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em trigo. *Rev. bras. Ci. Solo*, 1:15-30, 1977.
- NEYRA, C.A. & BERKUM, P. van. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.*, 23:306-10, 1977.
- NEYRA, C.A. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. *Adv. Agron.*, 29:1-38, 1977.
- NEYRA, C.A.; DÖBEREINER, J.; LALANDE, R. & KNOWLES, R. Denitrification by N₂-fixing *Spirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.*, 23:300-5, 1977.
- NUR, I.; OKON, Y. & HENIS, Y. An increase in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. *Can. J. Microbiol.*, 26:482-5, 1980a.
- NUR, I.; OKON, Y. & HENIS, Y. Comparative studies of nitrogen fixing bacteria associated with grasses in Israel with *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, 26:714-8, 1980b.
- PATRIQUIN, D.G. & DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.*, 24:734-42, 1978.
- RAO, N.S.S. Response of crops to *Azospirillum* inoculation in India. In: VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., ed. Associative N₂-fixation. Palm Beach, Florida, CRC Press Inc., 1981. p.137-44.
- SCOTT, C.A.; MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, V.L.D. & SCOTT, D.B. Numbers of *Azospirillum* spp. associated with the roots of field grown maize. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, R.H.; HOLLANDER, A.; FRANCO, A.A.; NEYRA, C.A. & SCOTT, D.B. Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York, Plenum Press, 1978. p.371-2.
- SMITH, R.L.; SCHANK, S.C. QUESENBERRY, K.H.; MILAN, J.M. & HUBBELL, D.H. Yield increases of tropical grain forage grasses after inoculation with *Spirillum lipoferum* in Florida. Univ. Florida, Dept. Agron. Soil Microbiol., 1976. Anual Report.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. & DOBEREINER, J. A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24:967-80, 1978.
- WATANABE, I.; LEE, K.K. & GUZMAN, M. de Seasonal change of N₂ fixing rate in rice field assayed by in situ acetylene reduction technique. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24:465-71, 1978.