

INTERAÇÕES E EFEITOS FISIOLÓGICOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA MANDIOCA¹

ELCIO LIBORIO BALOTA², ELI SIDNEY LOPES³,
MARIANGELA HUNGRIA⁴e JOHANNA DÖBEREINER⁵

RESUMO - Visando conhecer as interações entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), foram conduzidos vários experimentos para avaliar os efeitos de exsudatos de mandioca e de bactérias nos fungos micorrízicos, e a produção de ácido indolacético (AIA) *in vitro* pelas bactérias diazotróficas. Os experimentos evidenciaram que as bactérias diazotróficas estimularam a colonização micorrízica de *Glomus clarum* a partir do 30º dia. Os exsudatos de mandioca e das bactérias não apresentaram efeito na germinação de *Gigaspora gigantea*, mas influenciaram seu crescimento micelial. A adição de exsudatos de mandioca estimulou o crescimento das bactérias diazotróficas *in vitro*, evidenciando que podem existir, nos exsudatos, substâncias que atuam como sinais moleculares ou estimulantes do crescimento, e não como fatores nutricionais. As bactérias diazotróficas apresentam ainda capacidade de produzir AIA *in vitro*. *Azospirillum lipoferum* isolado da mandioca produziu até 130 µM de AIA após 48 horas de incubação, ao passo que *Klebsiella* sp. produziu cerca 60 µM, e a Bactéria E, aproximadamente 20 µM.

Termos para indexação: ácido indolacético, sinais moleculares, interação planta-microorganismos.

INTERACTIONS AND PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF DIAZOTROPHIC BACTERIA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN CASSAVA PLANTS

ABSTRACT - For better understanding of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria in cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz), several experiments were performed to check the effects of plant and bacteria exsudates on arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria indoleacetic acid (IAA) production. Diazotrophic bacteria stimulated mycorrhizal root colonization of *Glomus clarum* after 30 days. The beneficial effects could be related to growth promoting compounds able to stimulate plant susceptibility to mycorrhizal infection, spore germination or the growth of mycelium, being able to increase the contact between fungal hypha and plant roots and, consequently, to increase mycorrhizal colonization. Addition of cassava exsudates stimulated growth of diazotrophic bacteria *in vitro*, showing that they could contain molecular signals or growth stimulators, once the effects did not seem to be related to a nutritional factor. It was also observed that diazotrophic bacteria could produce IAA *in vitro*. *Azospirillum lipoferum* isolated from cassava produced up to 130 µM of IAA after 48 h of incubation, while *Klebsiella* sp. accumulated about 60 µM and Bacterium E approximately 20 µM of IAA.

Index terms: indoleacetic acid, molecular signals, plant-microbe interactions.

INTRODUÇÃO

O solo representa um ambiente heterogêneo que permite o desenvolvimento de grande diversidade de microorganismos, cujo equilíbrio é afetado por fatores bióticos e abióticos do ambiente. Ocorrem interações entre microorganismos do solo na rizosfera das plantas, mas que são pouco estudadas, como a dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e as bactérias diazotróficas.

¹ Aceito para publicação em 26 de setembro de 1995.

Extraído da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada ao Dep. de Solos da Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro.

² Biólogo, Ph.D., Inst. Agron. do Paraná-IAPAR, Caixa Postal 481, CEP 86001-970 Londrina, PR. Bolsista do CNPq.

³ Eng. Agr., Ph.D., Inst. Agron. de Campinas, Caixa Postal 28, CEP 130001-970 Campinas, São Paulo. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng^a Agr^a, Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 1061, Londrina CEP 86001-970. Bolsista do CNPq.

⁵ Eng^a Agr^a, Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), Caixa Postal 74505, Seropédica, CEP 23851-970 Itaguaí, RJ. Bolsista do CNPq.

Estudos de inoculação de fungos micorrízicos arbusculares com bactérias diazotróficas têm evidenciado que as bactérias podem incrementar o desenvolvimento e os teores de nutrientes nas plantas, a colonização micorrízica e a esporulação dos FMA (Bagyaraj & Menge, 1978; El-Raheem et al., 1989; Paula, 1992; Balota, 1994).

O efeito benéfico propiciado pela interação entre os FMA e bactérias diazotróficas pode ocorrer pelo incremento na absorção de P pelas plantas micorrizadas, proporcionando melhores condições para o estabelecimento da associação com as diazotróficas, que apresenta elevado custo energético (Barea & Azcon-Aguilar, 1983). Paula et al. (1991) argumentam que os mecanismos de infecção e colonização da planta hospedeira, pelas bactérias diazotróficas, poderiam ser mediados pela infecção micorrízica uma vez que, no processo de penetração das hifas infectivas, ocorre maior exsudação de nutrientes, podendo acelerar o crescimento das bactérias diazotróficas.

Existem, ainda, evidências de que algumas bactérias rizosféricas podem aumentar a susceptibilidade das plantas à infecção micorrízica, o que pode ocorrer em face de vários fatores, como mudanças na permeabilidade da parede celular e no padrão de liberação de exsudatos radiculares (Azcón, 1989).

Os exsudatos de plantas podem influenciar o desenvolvimento dos FMA e das bactérias, tanto no nível nutricional como na presença de fatores não nutricionais (Becard & Piche, 1989; Paula & Siqueira, 1990; Siqueira et al., 1991). Os compostos exsudatos pela planta podem atuar como sinais moleculares, ativando o crescimento micelial ou crescimento das bactérias (Paula & Siqueira, 1990), ou como indutores da formação do apressório, promovendo o contato entre a hifa fúngica e a célula vegetal e atuando, assim, tanto no processo pré-infectivo como no infectivo (Becard & Piche, 1989; Siqueira et al., 1991).

Apesar de os esporos de fungos MA possuírem a capacidade metabólica para a germinação e crescimento das hifas, esses eventos ocorrem somente quando os fatores indutores endógenos, particularmente a idade fisiológica, e os fatores do meio forem favoráveis. Assim, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos objetivando conhecer os efeitos de

fatores físicos, químicos e biológicos sobre a germinação e o crescimento de hifas de fungos MA. Muitos desses estudos utilizaram esporos esterilizados superficialmente, observando-se o efeito da concentração de sais minerais, fontes de carbono, aminoácidos, vitaminas, bem como extratos de solos (Siqueira & Hubbell, 1986) e exsudatos radiculares (Graham, 1982; Elias & Safir, 1987; Gianinazzi-Pearson et al., 1989).

Para Smith & Gianinazzi-Pearson (1989), alguns sinais das plantas podem ser necessários para ativar o crescimento micelial, mesmo não ocorrendo contato físico. Entretanto, tem sido salientado que estes efeitos podem resultar tanto da ação destes compostos na fisiologia das plantas, principalmente no que tange às raízes, como de sua ação direta sobre os propágulos do fungo na rizosfera. Além disso, a germinação e alongação dos fungos MA podem ser estimuladas por bactérias antes do seu contato com células radiculares, podendo resultar em uma aceleração do processo de infecção e disseminação da colonização micorrízica nas raízes (Abbott & Robson, 1981). Esse estímulo poderia ocorrer pela excreção de vitaminas e ácidos orgânicos - que atuariam como ativadores metabólicos (González-López et al., 1983) -, ou substâncias estimuladoras do desenvolvimento micelial dos fungos, como observado por Siqueira et al. (1991) e Paula (1992).

Diversas bactérias, presentes na rizosfera, particularmente as diazotróficas, também podem incrementar o crescimento e a produtividade das plantas pela produção de hormônios, como o ácido indolacético (AIA), que induzem à proliferação das raízes laterais e de pêlos absorventes, aumentando, assim, a superfície de absorção de nutrientes (Tien et al., 1979; De Francisco et al., 1985; Zimmer & Bothe, 1988). Muitos destes efeitos estimulatórios obtidos pela inoculação destas bactérias são similares aos apresentados com a aplicação de fito-hormônios (Kolb & Martin, 1985; Barbieri et al., 1988; Martin et al., 1989).

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito dos exsudatos radiculares e de substâncias produzidas por bactérias rizosféricas, sobre determinados grupos de microorganismos (particularmente fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas ou promotoras do crescimento de plantas).

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito de bactérias diazotróficas na colonização micorrízica

O experimento foi montado em vasos de 1 litro de volume, tendo, como substrato, solo arenoso (LVA) fumigado com brometo de metila. No experimento foram utilizadas plântulas de mandioca micropropagada da cultivar Vassourinha (BGM-006, CNPMF/EMBRAPA). Os tratamentos utilizados foram: controle inoculado com *G. clarum*; *G. clarum* + Bactéria E, E-30; *G. clarum* + *Azospirillum lipoferum*, M-33 e *G. clarum* + *Klebsiella* sp, M-51. As bactérias foram crescidas em meio YM modificado, por 24 horas, após o que, as culturas foram padronizadas pela leitura da absorbância seguida de diluição e contagem em câmara de "Neubauer". Foram inoculados 2 ml do inóculo (10^8 células por ml) nas raízes das plântulas. Nos tratamentos com fungos MA, foram inoculados 100 esporos de *G. clarum* na região das raízes. Foram feitas avaliações da colonização micorrízica aos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 dias após a instalação do experimento. Das raízes finas, 500 mg foram clarificadas e coradas, baseando-se na metodologia de Phillips & Hayman (1970), como descrito em Colozzi Filho & Balota (1994), e a colonização micorrízica foi avaliada pelo método da placa riscada (Giovannetti & Mosse, 1980). Nas análises estatísticas, os dados foram transformados para arco seno $\sqrt{x/100}$.

Obtenção de exsudatos de mandioca e de bactérias diazotróficas

Na obtenção de exsudatos de mandioca, plântulas de mandioca micropropagadas da cultivar Vassourinha foram colocadas em tubos de ensaio 25 x 200 mm com 20 ml de meio MS líquido (Murashige & Skoog, 1962), com 30% da força iônica, e incubadas em câmara de crescimento a 25°C, sob agitação constante (50 rpm), para aeração do sistema radicular. Após 15 dias, as plantas foram retiradas, e o meio líquido contendo os exsudatos radiculares das plântulas foi filtrado em membranas de nitrocelulose Millipore de 0,22 µm de diâmetro de poro, e considerado como "exsudato de mandioca".

A obtenção de "exsudatos de bactérias diazotróficas", estirpe da Bactéria E (E-30), *Azospirillum lipoferum* (M-33) e *Klebsiella* sp (M-51), todas isoladas da mandioca, está representada na Fig. 1, onde o meio YM (Vincent, 1970) foi modificado para 1 g de manitol e 200 mg de extrato de levedura por litro.

Efeito de exsudatos de mandioca e de bactérias diazotróficas na germinação e crescimento micelial de fungos MA

Foram utilizados esporos de *Gigaspora gigantea*, provenientes de vaso de multiplicação com *Brachiaria*

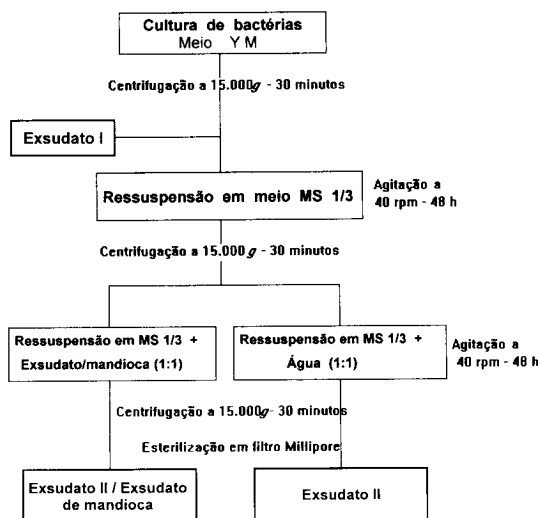


FIG. 1. Procedimento utilizado na obtenção de exsudatos de bactérias diazotróficas em meio enriquecido (YM modificado) ou meio mínimo (MS 1/3), na presença, ou não, de exsudato de mandioca.

decumbens como planta hospedeira, e solo-areia (1:1, v/v) como substrato. Os esporos foram extraídos do solo pela técnica do peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), centrifugados em solução de sacarose a 45%, e desinfestados, superficialmente, através de lavagens sucessivas em filtro Millipore tipo "Swinnex", com solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 20 minutos, sulfato de estreptomicina, a 100 rpm, por 30 minutos, e em água esterilizada, por 20 minutos, num fluxo de 1 ml/minuto (Colozzi Filho, 1988). Após a desinfestação dos esporos, estes foram colocados sobre o meio (água/ágar, 1%) em placas-de-Petri, onde foram adicionados, previamente, exsudatos de mandioca e bactérias diazotróficas (Bactéria E, E-30; *A. lipoferum*, M-33 e *Klebsiella* sp., M-51) nas concentrações de 1% e 5% (v/v).

O experimento foi montado num esquema fatorial em blocos ao acaso, com cinco repetições, cada placa-de-Petri (com dez esporos) considerada como uma repetição. As placas-de-Petri foram incubadas a 25°C, no escuro, por 20 dias, quando se avaliaram a germinação e o crescimento micelial. Foram considerados germinados os esporos que emitiram pelo menos um tubo germinativo. O crescimento micelial foi avaliado pela atribuição de notas, numa escala de 0 a 4, de acordo com o comprimento da hifa: 0=sem crescimento; 1=comprimento menor que 5 mm; 2=5 a 10 mm; 3= 10 a 15 mm e 4= maior que 15 mm, segundo Siqueira et al. (1982).

Efeito dos exsudatos de mandioca no crescimento de bactérias diazotróficas

Estirpes de bactérias diazotróficas isoladas da mandioca, Bactéria E (E-30), *A. lipoferum* (M-33) e *Klebsiella* sp. (M-51) foram pré-cultivadas por 24 horas nos seus respectivos meios líquidos (GOC, LGI-P e NFb), segundo Balota (1994), com 200 mg de extrato de levedura por litro, centrifugadas a 15.000 g por 30 minutos e lavadas por três vezes em solução tampão fosfato 0,06 M esterilizadas e centrifugadas novamente, para remover possíveis resíduos da cultura e, finalmente, ressuspensas na mesma solução-tampão com o mesmo volume. Aliquotas de 0,1 ml foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 ml do meio YM líquido com 1 g da fonte de carbono (0,5 g de sacarose e 0,5 g de manitol/l) e 200 mg de extrato de levedura por litro, sendo considerado como meio mínimo, como sugerido por Hartwig et al. (1991), adicionando-se 1 ml de exsudato de mandioca esterilizado. As bactérias foram cultivadas sob agitação constante (40 rpm) a 28°C. As avaliações da leitura da densidade óptica a 560 nm e do teor de proteína foram realizadas às 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação. O teor de proteína foi avaliado pela reação de Lowry (Lowry et al., 1951) com "Sigma Protein assay Kit no. P5656".

Produção de AIA por bactérias diazotróficas

A estirpe da Bactéria E (E-30), *A. lipoferum* (M-33) e *Klebsiella* sp. (M-51) isoladas da mandioca foram pré-cultivadas, por 24 horas, nos seus respectivos meios líquidos (GOC, LGI-P e NFb com três vezes a concentração de fosfato), centrifugadas a 15.000 g por 30 minutos, lavadas por três vezes em solução-tampão fosfato 0,06 M esterilizada, e depois centrifugadas novamente, objetivando remover possíveis resíduos de fito-hormônios, e, finalmente, ressuspensas na mesma solução tampão com mesmo volume. Aliquotas de 0,1 ml desta cultura foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 16 ml de meio líquido (GOC, LGI-P e NFb) na ausência ou presença de 0,3 mM de L-triptofano, esterilizado via filtro Millipore de nitrocelulose (0,22 µm). Estas bactérias foram cultivadas sob agitação (40 rpm), no escuro (pois a luz oxida o AIA), a 28°C.

Foram realizadas avaliações do crescimento das bactérias, mudanças do pH do meio, e acúmulo de AIA, com 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação, em três repetições. O crescimento das bactérias foi avaliado pela leitura da absorbância em 560 nm, e o número de unidades formadoras de colônias/ml (UFC/ml), pela diluição sucessiva (10^{-1} a 10^{-9}) em solução salina e inoculação de 0,1 ml em placas-de-Petri com os respectivos meios sólidos, e sua concentração expressa em UFC por ml de cultura. Para a avaliação do AIA, as culturas

foram centrifugadas a 15.000 g por 30 minutos, e o sobrenadante, filtrado em membranas millipore 0,22 µm antes de ser submetido à metodologia colorimétrica com reagente de Salkowski (Gordon & Weber, 1951), modificada por Minamisawa et al. (1992). Nesta metodologia, para cada parte do sobrenadante da bactéria foram adicionadas duas partes de FeCl_3 0,01 M em HClO_4 35% e, após 25 minutos, as leituras da absorbância foram feitas a 530 nm, em três repetições. A quantificação do AIA foi feita através da curva-padrão obtida com concentrações de 0 a 250 µM do padrão de AIA. Na avaliação do AIA por cromatografia líquida de alta pressão, o sobrenadante do meio foi extraído com acetato de etila em pH 2,8, e analisado a 278 nm, pela injeção de 20 µl em HPLC (High performance liquid chromatography) Waters mod. 510, utilizando coluna Novapak C18 com 15 cm de comprimento, tendo como solvente metanol:ácido fosfórico 1% em água (40:60, v/v), a um fluxo de 1 ml/min. O tempo de retenção para o pico foi comparado com o pico do AIA-padrão, e a quantificação foi realizada pela integração da área pelo microprocessador do módulo de dados Waters.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de bactérias diazotróficas na colonização micorrízica

Todas as bactérias testadas estimularam a colonização micorrízica até 80 dias após a inoculação (Tabela 1). A inoculação com a Bactéria E já apresentava um efeito positivo no 20º dia, e, a partir do 30º dia, estimulou a colonização, significativamente, com um aumento de 98%, permanecendo superior em todas as épocas de amostragens. A inoculação de *A. lipoferum* apresentou tendência de aumentar a colonização micorrízica, em relação ao tratamento do fungo isolado, em todas as épocas de amostragens, mas foi significativo apenas a partir do 70º dia (30% a 46%). A presença de *Klebsiella* sp. não influenciou a colonização micorrízica em relação ao tratamento do fungo isolado.

Os fungos MA e os microorganismos rizosféricos podem interagir, influenciando mutuamente seus desenvolvimentos (Azcón, 1989). A germinação dos esporos e alongação das hifas dos fungos MA, por exemplo, podem ser estimuladas por bactérias antes do seu contato com células radiculares, podendo resultar, assim, em uma aceleração do processo de infecção e disseminação da colonização micorrízica nas raízes (Abbot & Robson, 1981).

TABELA 1. Colonização micorrízica de *G. clarum* em raízes de mandioca inoculada com bactérias diazotróficas. Médias de quatro repetições.

Dias após a inoculação	Colonização micorrízica (%)			
	<i>G. clarum</i>	<i>Gc</i> + Bact E	<i>Gc</i> + <i>A.lipo</i>	<i>Gc</i> + <i>Kleb</i>
10	3,00 a	5,00 a	5,00 a	3,00 a
20	7,78 a	11,38 a	9,76 a	9,83 a
30	11,51 bc	22,90 a	17,91 ab	11,51 bc
40	18,39 b	29,18 a	19,78 b	17,00 b
50	22,95 c	38,13 a	33,19 ab	25,86 bc
60	34,98 b	46,39 a	42,75 ab	35,15 b
70	40,74 b	53,26 a	53,29 a	52,00 a
80	45,17 b	65,22 a	66,16 a	54,18 b

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Azcón (1989) observou uma tendência de estímulo na infecção micorrízica de *Glomus* em plantas de tomateiro com a inoculação de bactérias rizosféricas. Meyer & Linderman (1986), por sua vez, observaram que a inoculação de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas aumentou a colonização de 7% a 23% nas seis primeiras semanas, estabilizando-se em níveis similares na décima segunda semana. Paula (1992), na cultura da batata-doce, observou incremento na colonização micorrízica e na densidade de esporos com a inoculação de bactérias diazotróficas. A maior colonização micorrízica pode ocorrer pelo estímulo que as bactérias exercem na germinação, crescimento das hifas e formação de vesículas e distribuição e sobrevivência do micélio pós-infectivo.

Existem evidências de que algumas bactérias rizosféricas podem aumentar a susceptibilidade das plantas à infecção micorrízica, através de mudanças na permeabilidade da parede celular e no padrão de liberação de exsudatos radiculares (Azcón, 1989). Os FMA podem ainda ser favorecidos pela produção de fito-hormônios pelas bactérias. Muitas bactérias possuem, ainda, capacidade de produzir e excretar, em pequenas quantidades, substâncias como vitaminas e ácidos orgânicos (González-López et al., 1983), que podem afetar a germinação dos esporos de fungos MA (Hepper & Jakobsen, 1983).

Efeito de exsudatos de mandioca e de bactérias diazotróficas na germinação e crescimento micelial de fungos MA

Não houve efeito da concentração de exsudatos de bactérias diazotróficas ou de mandioca na ger-

minação dos esporos, com exceção da *Klebsiella* na concentração de 1% (Tabela 2). Do mesmo modo, também não houve efeito benéfico da adição desses exsudatos no crescimento micelial (dados não mostrados). Entretanto, a Fig. 2 mostra que houve diferenças na frequência de ocorrência das notas de crescimento micelial, em função da aplicação dos exsudatos. Exsudatos da Bactéria E (E-30) e de *A. lipoferum* (M-33), a 1%, diminuíram a frequência de ocorrência de notas menores (1 e 2) e aumentaram em 36% e 17%, respectivamente, a frequência de ocorrência da nota 4. Os exsudatos de mandioca a 1% aumentaram, em 36%, a frequência de ocorrência da nota 4, o mesmo não ocorrendo com a concentração de 5%.

Foi observado incremento na germinação, crescimento micelial e bifurcação das hifas de *G. etunicatum*, em função da adição de flavonóides, que são exsudados naturalmente pelas sementes e raízes de plântulas de alfafa, *Medicago sativa* (Phillips & Tsai, 1992). Aumentos na elongação de hifas de *G. fasciculatum* também foram obtidos com exsudatos de trevo (Elias & Safir, 1987).

Gianinazzi-Pearson et al. (1989) observaram efeito inibitório de até 27% na germinação de *G. margarita* com a aplicação de exsudato de tremoço (*Lupinus* sp.) e estímulo de até 173% com exsudatos de trevo (*Trifolium* sp.). Exsudatos de tremoço não influenciaram o crescimento micelial, enquanto os de trevo estimularam em até 282%. Para os autores, o fato de exsudatos de tremoço, planta não-hospedeira, apresentarem ausência de estímulo ou efeito

TABELA 2. Germinação de esporos de *G. gigantea*, após 20 dias de incubação, em função da adição, ao meio, de 1% e 5% de exsudato de mandioca e de bactérias diazotróficas. Médias de cinco repetições.

Tratamentos de exsudatos	Germinação dos esporos (%)*	
	Concentração dos exsudatos	
	1%	5%
Controle	73 a A**	69 a A
Bactéria E (E-30)	84 a A	78 a A
<i>A. lipoferum</i> (M-33)	75 a A	75 a A
<i>Klebsiella</i> sp. (M-51)	39 b B	84 a A
Exs. Mandioca	78 a A	70 a A
Média	70 A	75 A

* Dados transformados para arco seno $\sqrt{x/100}$.
 **Letras minúsculas comparam na coluna; letras maiúsculas comparam na linha pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

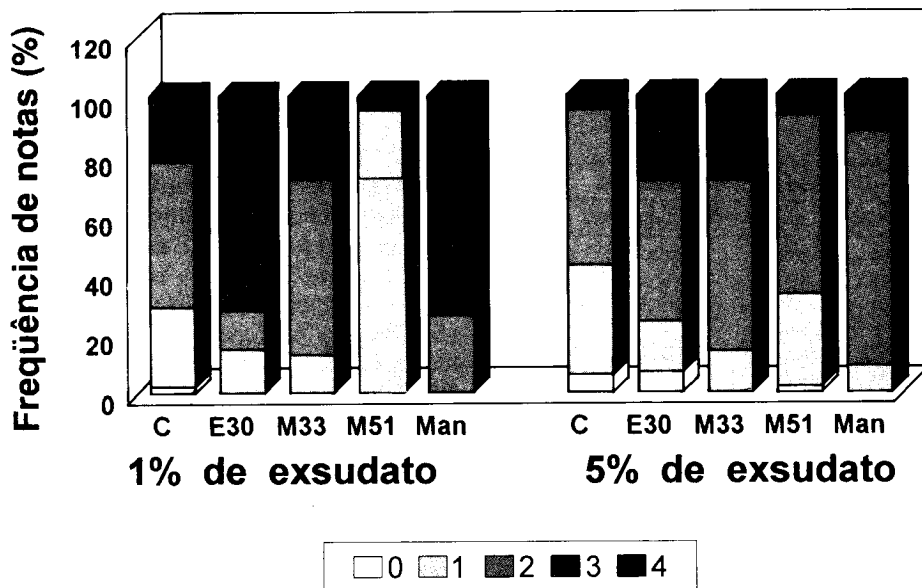


FIG. 2. Frequência de ocorrência das notas do crescimento micelial de *G. gigantea*, em função da adição de 1% e 5% de exsudato de mandioca e de bactérias diazotróficas (Bactéria E, E-30; *A. lipoferum*, M-33 e *Klebsiella* sp., M-51) ao meio. Médias de cinco repetições.

negativo na germinação e crescimento micelial de FMA, e os de trevo, planta hospedeira, apresentarão efeito estimulatório, sugere que plantas micorrízicas produzem substâncias que influenciam as fases pré-infecção, atuando como fatores determinantes da infecção e colonização das raízes.

Por outro lado, a ausência de estímulos dos exsudatos de mandioca e baixos estímulos de exsudatos de bactérias diazotróficas na germinação, observados neste trabalho, de certa forma são explicados pela literatura, que salienta que, aparentemente, os FMA não requerem fatores nutricionais externos para sua germinação, possuindo, intrinsecamente, a capacidade metabólica para que isso ocorra (Tommerup, 1985), mas sendo influenciados pelos fatores como pH, temperatura e meios enriquecidos (Siqueira et al., 1985).

Efeito dos exsudatos de mandioca no crescimento de bactérias diazotróficas

A Bactéria E apresentou um rápido crescimento nas primeiras 24 horas, permanecendo mais ou menos estável após esta fase. A adição de exsudatos de

mandioca incrementou o crescimento da Bactéria E em 33% quando avaliado pelo teor de proteína, e em 94% quando avaliado pela densidade óptica. Estas diferenças permaneceram constantes até a avaliação, realizada com 96 horas de incubação (Fig. 3). A adição de exsudatos de mandioca também estimulou o crescimento de *A. lipoferum* (M-33), avaliado tanto pela DO como pelo teor de proteína (Fig. 4). Tanto *A. lipoferum* como *Klebsiella* sp. isolada da mandioca (M-51) apresentaram crescimento acentuado nas primeiras 24 horas. No que se refere à *Klebsiella*, a DO em meio com adição de exsudatos de mandioca, já nas primeiras 24 horas, foi superior à DO do meio sem exsudatos, permanecendo constante a diferença posteriormente (Fig. 5). Com relação ao acúmulo de proteína, a adição de exsudatos de mandioca estimulou positivamente, em 95%, o crescimento de *Klebsiella* na fase logarítmica, permanecendo constante com até 96 horas de incubação.

O maior desenvolvimento das bactérias com a adição de exsudatos de mandioca parece não estar relacionado com o suprimento de carbono, uma vez que já ocorreu nas primeiras 24 horas, tempo em que ainda havia suprimento suficiente para o cresci-

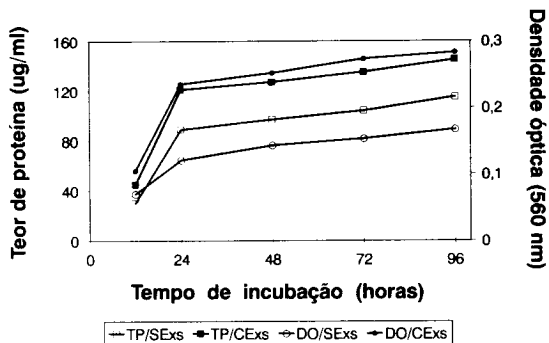


FIG. 3. Crescimento da bactéria E, E-30 (teor de proteína e densidade óptica) em função da adição de exsudato de mandioca ao meio. Médias de três repetições. TP/SExs=teor de proteína em meio sem exsudato; TP/CExs=teor de proteína em meio com exsudato; DO/SExs=densidade óptica em meio sem exsudato; DO/CExs=densidade óptica em meio com exsudato.

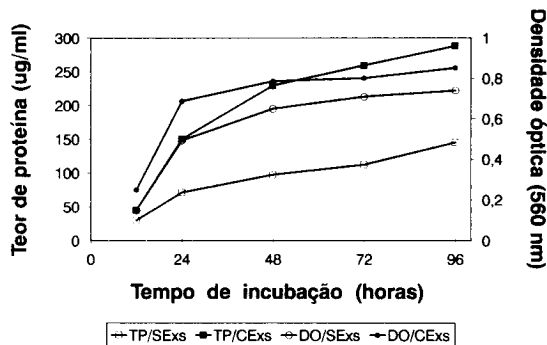


FIG. 5. Crescimento de *Klebsiella* sp., M-51, (teor de proteína e densidade óptica) em função da adição de exsudato de mandioca ao meio. Médias de três repetições. TP/SExs=teor de proteína em meio sem exsudato; TP/CExs=teor de proteína em meio com exsudato; DO/SExs=densidade óptica em meio sem exsudato; DO/CExs=densidade óptica em meio com exsudato.

mento das bactérias. Essa observação já havia sido feita por Hartwig et al. (1991), com *Rhizobium meliloti*, que sugerira que esse efeito poderia estar relacionado a um fator ainda não conhecido, talvez uma substância funcionando como "sinais moleculares".

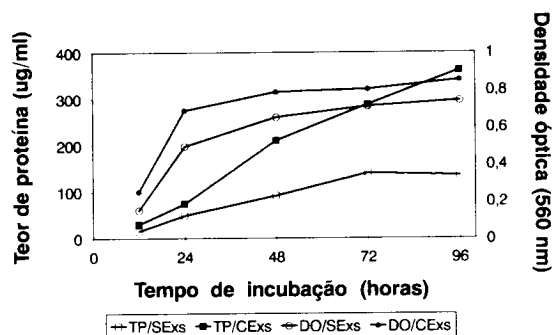


FIG. 4. Crescimento de *A. lipoferum*, M-33 (teor de proteína e densidade óptica) em função da adição de exsudato de mandioca ao meio. Médias de três repetições. TP/SExs=teor de proteína em meio sem exsudato; TP/CExs=teor de proteína em meio com exsudato; DO/SExs=densidade óptica em meio sem exsudato; DO/CExs=densidade óptica em meio com exsudato.

Produção de AIA por bactérias diazotróficas

O acúmulo de AIA no meio com a estirpe E-30, da Bactéria E, ocorreu independentemente da presença de triptofano, apesar de, na presença desse aminoácido, que é precursor da síntese do fito-hormônio AIA, ser significativamente superior (Fig. 6). Na presença de triptofano, houve acúmulo crescente de AIA no meio, após a fase log de crescimento, com pico de acúmulo (20 µM) ocorrendo após 72 horas de incubação.

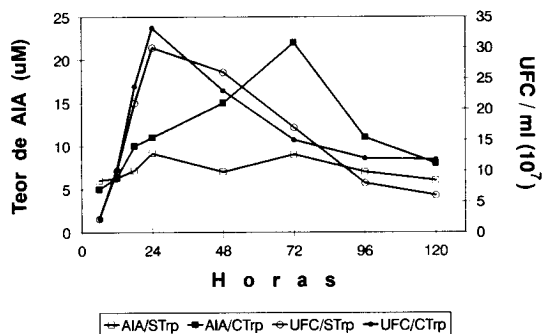


FIG. 6. Crescimento da Bactéria E, E-30, isolada da mandioca (UFC/ml), e acúmulo de AIA no meio, em função do tempo de incubação. Médias de três repetições. AIA=teor de AIA; UFC=unidade formadora de colônia; STrp=sem triptofano; CTrp=com triptofano.

A evolução do pH evidencia que o seu aumento foi contínuo, independentemente da adição de triptofano, apesar de, ao final do experimento (96 e 120 horas de incubação), o meio com adição de triptofano ter permanecido com pH relativamente constante (7,3), enquanto nos meios sem adição de triptofano, o pH ter aumentado para 7,8.

Klebsiella sp., M-51, também acumulou AIA *in vitro* independente da adição de triptofano, embora, na presença deste, houvesse acúmulo significativamente superior (60 μM) ao observado no meio isento (25 μM) desse aminoácido (Fig. 7). No meio sem triptofano, houve discreto acúmulo de AIA até as 120 horas de incubação, ao passo que no meio com triptofano houve acentuado acúmulo após a fase log de crescimento, com 72 horas de incubação, e ocorreu um decréscimo com 96 e 120 horas de incubação. Na evolução do pH, houve contínua diminuição, em função do tempo de incubação, independentemente da adição de triptofano.

Na Fig. 8 pode ser visualizado que a estirpe de *A. lipoferum* (M-33) acumulou AIA no meio independente da adição de triptofano. No meio sem adição de triptofano, M-33 acumulou em torno de 40 μM de AIA após 48 horas de incubação, e permaneceu constante até 120 horas enquanto que, com adição de triptofano, houve grande acúmulo (130 μM) imediatamente após a fase log de crescimento (48 h), com acentuado decréscimo posterior até as 120 horas de incubação. Houve um aumento constante do pH do meio, até em torno de 7,5.

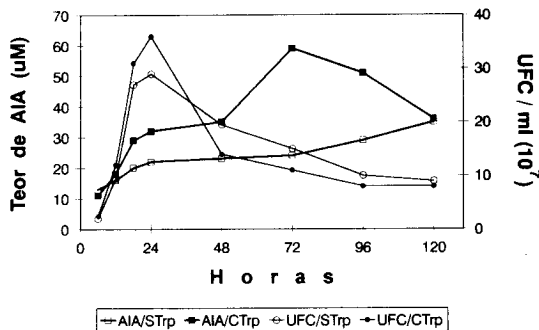


FIG. 7. Crescimento de *Klebsiella* sp, M-51, isolada da mandioca (UFC/ml) e acúmulo de AIA no meio, em função do tempo de incubação. Médias de três repetições. AIA=teor de AIA; UFC=unidade formadora de colônia; STrp=sem triptofano; CTrp=com triptofano.

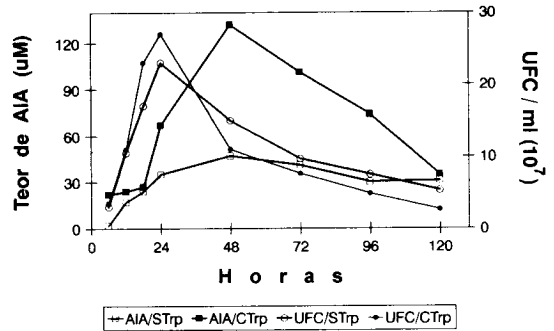


FIG. 8. Crescimento de *Azospirillum lipoferum*, M-33, isolado da mandioca (UFC/ml) e acúmulo de AIA no meio, em função do tempo de incubação. Médias de três repetições. AIA=teor de AIA; UFC=unidade formadora de colônia; STrp=sem triptofano; CTrp=com triptofano.

Os valores obtidos foram similares aos observados por Mascaraue-Esparza et al. (1988) - que variaram de 28,54 a 97,03 μM em estirpes de *A. lipoferum* originárias de plantas de cactáceas no México, aos observados por Crozier et al. (1988) (0,0 a 85,9 μM) em estirpes isoladas de raízes de milho -, e aos obtidos por Horemans et al. (1986), que detectaram de 15,70 a 51,37 μM de AIA no meio após 144 horas de incubação e avaliados pelo método colorimétrico e em cromatografia líquida.

Na avaliação em HPLC, os valores de acúmulo de AIA observados foram inferiores aos obtidos pelo método colorimétrico, e acumularam teores na faixa de 1,32 a 18,46 μM , mas são similares aos obtidos por Crozier et al. (1988), que obtiveram valores que variaram de 0,29 a 23,4 μM em estirpes de *A. lipoferum* isoladas de raízes de milho. As diferenças de concentração entre os dois métodos podem ter ocorrido por ajuste de metodologia, particularmente no que tange ao HPLC.

Constatou-se, portanto, que todas as bactérias diazotróficas utilizadas apresentaram capacidade de acumular AIA no meio, independentemente da adição de triptofano, embora a produção tenha sido incrementada pela adição desse aminoácido. As bactérias apresentaram capacidade diferenciada de produzir AIA, como já constatado anteriormente por Tien et al. (1979) e por Hartmann et al. (1983). O crescimento das bactérias, avaliado pelo número de UFC, aumentou rapidamente nas primeiras 24 ho-

ras (fase logarítmica de crescimento), e declinou, posteriormente, de maneira acentuada. Todas as bactérias apresentaram o pico de acúmulo de AIA após a fase logarítmica de crescimento. Não houve produção de AIA anterior a essa fase, ou pelo menos os níveis não foram detectáveis pelas metodologias utilizadas.

Para Omay et al. (1993), a formação de quantidade elevada de AIA no final da fase log de crescimento resulta de mudanças no metabolismo fisiológico das bactérias nesta fase de desenvolvimento. Assim, neste estágio, aparentemente mais AIA é sintetizado que o necessário para a regulação de suas funções. Esses autores sugeriram, também, que a exaustão de carbono no meio pode resultar em aumento na síntese de AIA por *Azospirillum*, e que, em condições de rizosfera, com forte competição pelos substratos orgânicos exsudados pelas raízes, poderia ocorrer incremento na síntese de AIA. Além disso, o triptofano exsudado pelas raízes poderia estimular a produção de AIA por bactérias rizosféricas, apesar de Omay et al. (1993) salientarem que estas quantidades de triptofano exsudadas pelas raízes podem não ser suficientes para que isso ocorra. Entretanto, Narayanaswami & Veerajou (1969) observaram uma quantidade três vezes maior de AIA na rizosfera, comparada a ambientes não-rizosféricos. Além disso, Sarwar et al. (1992), estudando 19 solos, observaram que estes apresentaram capacidade diferenciada na síntese de AIA, que variou de 18,2 a 303,0 mg de AIA-equivalente/kg de solo, o que poderia ser atribuído às diferenças físico-químicas e, principalmente, biológicas, do solo.

Horemans & Vlassak (1985) acreditam que existe relação entre a difusão de AIA da célula e o aumento do pH externo, e sugerem que o hormônio pode ser distribuído entre células e no meio ao redor, dependendo da diferença de pH entre o meio e o compartimento celular. Já Omay et al. (1993), estudando o acúmulo de AIA no meio, em sistema com manutenção do pH constante, evidenciaram que o maior acúmulo de AIA na fase estacionária parece não ocorrer, em função apenas de mudanças nos processos envolvidos na transferência de AIA através das membranas bacterianas, mas também devido à liberação de triptofano das células mortas, que estimulariam a produção de auxinas (Zimmer & Bothe, 1988).

CONCLUSÕES

1. A Bactéria E, E-30, aumenta a colonização micorrízica a partir do 30º dia, e *A. lipoferum* M-33, a partir do 50º dia.
2. Os exsudatos de mandioca e os exsudatos de bactérias diazotróficas estimulam o crescimento micelial do fungo micorrízico arbuscular *G. gigantea*.
3. Exsudatos da mandioca estimulam o crescimento das bactérias diazotróficas (*Klebsiella* sp. *A. lipoferum* e Bactéria E) *in vitro*, a partir das primeiras 24 horas de crescimento.
4. Todas as bactérias diazotróficas utilizadas sintetizam AIA *in vitro*, independentemente da presença de triptofano.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum type. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, v.32, p.631-639, 1981.
- AZCÓN, R. Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v.21, p.639-644, 1989.
- BAGYARAJ, D.J.; MENGE, J.A. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. *New Phytologist*, London, v.80, p.567-573, 1978.
- BALOTA, E.L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Itaguaí: UFRRJ, 1994. 281p. Tese de Doutorado.
- BARBIERI, P.; BERNARDI, A.; GALLI, E.; ZANETTI, G. Effects of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on wheat root development. In: KLINGMULLER, W. *Azospirillum IV: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p.181-188.
- BAREA, J.M.; AZCON-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Advances in Agronomy*, New York, v.36, p.1-54, 1983.

- BECARD, G.; PICHE, Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exsudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.2320-2325, 1989.
- COLOZZI FILHO, A. **Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares**. Lavras: ESAL, 1988. 80p. Dissertação de Mestrado.
- COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.383-418.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M. Analysis of indole-3-acetic and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2833-2837, 1988.
- DE FRANCISCO, R.; ZANETTI, G.; BARBIERI, P.; GALLI, E. Auxin production by *Azospirillum brasilense* under different culture conditions. In: KLINGMULLER, W. **Azospirillum IV: Genetics, Physiology, Ecology**. Berlím: Springer-Verlag, 1985. p. 109-115.
- EL-RAHEEM, A.; EL-SHANSHOURY, R.; HASSAN, M.A.; ABDEL-GHAFFAR, B.A. Synergistic effect of vesicular-arbuscular-mycorrhizas and *Azotobacter chroococcum* on the growth and the nutrient contents of tomato plants. **Phyton**, Austria, v.29, p.203-212, 1989.
- ELIAS, K.S.; SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exsudates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.1928-1933, 1987.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.46, p.235-246, 1963.
- GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRANZANTI, B.; GIANINAZZI, S. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exsudates and plant flavonoids. **Symbiosis**, Rehovot, v.7, p.243-255, 1989.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, London, v.84, p. 489-500, 1980.
- GONZÁLES-LÓPEZ, J.; SALMERÓN, V.; MORENO, V.; RAMOS-CORMENZANA, A. Amino acids and vitamins produced by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.15, p.711-713, 1983.
- GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Lancaster, v.26, p.192-195, 1951.
- GRAHAM, J.H. Effect of citrus root exsudates on germination of chytrid spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeum*. **Mycologia**, New York, v.74, p.831-835, 1982.
- HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.916-923, 1983.
- HARTWIG, U.A.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, Baltimore, v.95, p.797-803, 1991.
- HEPPER, C.M.; JAKOBSEN, I. Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus caledonium*: effect of amino acids. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.15, p.55-59, 1983.
- HOREMANS, S.; VLASSAK, K. Production of indol-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense*. In: KLINGMULLER, W. **Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology**. Berlím: Springer-Verlag, 1985. p. 98-108.
- HOREMANS, S.; DE KONNINCK, K.; NEURAY, J.; HERMANN, R.; VLASSAK, K. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and the rhizosphere bacteria. **Symbiosis**, Rehovot, v.2, p.341-346, 1986.
- KOLB, W.; MARTIN, P. Response of plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indoleacetic acid. In: KLINGMULLER, W. **Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology**. Berlím: Springer-Verlag, 1985. p.215-221.
- LOWRY, O.; ROSENBOUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, H.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. **Journal Biology & Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.
- MARTIN, P.; GLATZLE, A.; KOLB, W.; OMAI, H.; SCHIMIDT, W. N₂-fixing bacteria in the rhizosphere: quantification and hormonal effects on root development. **Zütschrift für Pflanzenernährung, Bodenk.**, v.152, p.237-245, 1989.

- MASCARUA-ESPARZA, M.A.; VILLA-GONZALEZ, R.; CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.106, p.91-95, 1988.
- MEYER, J.R.; LINDERMAN, R.G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.18, p.185-190, 1986.
- MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMIT, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2832-2839, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NARAYANASWAMI, R.; VEERRAJU, V. IAA synthesis in paddy soil as influenced by ammonium sulfate fertilization. **Current Science**, Bangalore, v.38, p.517-518, 1969.
- OMAY, S.H.; SCHIMIDT, W.A.; MARTIN, P.; BANGERTH, F. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p.187-192, 1993.
- PAULA, M.A. **Interação micorrizas vesículo-arbusculares e bactérias diazotróficas em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam.)**. Itaguaí: UFRRJ, 1992. Tese de Doutorado.
- PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v.11, p.111-115, 1991.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. **New Phytologist**, Cambridge, v.115, p.69-75, 1990.
- PHILLIPS, D.A.; TSAI, S.M. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes. **Mycorrhiza**, Secaucus, v.1, p.55-58, 1992.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.55, p.158-161, 1970.
- SARWAR, M.; ARSHAD, M.; MARTINS, D.A.; FRANKENBERGER JUNIOR, W.T. Tryptophan dependent biosynthesis of auxins in soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.147, p.207-215, 1992.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H. Effect of organic substrates on germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spores *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.5, p.523-527, 1986.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; SCHENCK, N.C. Germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **Mycologia**, New York, v.74, p.952-959, 1982.
- SIQUEIRA, J.O.; NAIR, M.G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.10, p.63-121, 1991.
- SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J.; HUBBELL, D.H. Spores germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.31, p.965-970, 1985.
- SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.39, p.221-244, 1989.
- TIEN, T.M.; GASKENS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.
- TOMMERUP, I.C. Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.85, p.267-278, 1985.
- VINCENT, J.M. **A practical manual for the study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Pub., 1970. 164p. (International Biological Program Handbook, 15).
- ZIMMER, W.; BOTHE, H. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.110, p.239-247, 1988.