

## Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz

Tharwat El-Sayed El-Desouk Radwan<sup>(1)</sup>, Zeinat Kamel Mohamed<sup>(1)</sup> e Veronica Massena Reis<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Faculty of Science, Botanical Department, Egypt El-Fayoum <sup>(2)</sup>Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 47, Caixa Postal 74.505, CEP 23851-970 Seropédica, RJ. E-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

Resumo – Bactérias fixadoras de nitrogênio podem contribuir para o crescimento vegetal pela produção de auxinas. Os objetivos deste trabalho foram quantificar a produção de hormônios de crescimento por estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio e avaliar o efeito da inoculação destas estirpes em plântulas de milho e trigo. Todas as estirpes avaliadas começaram a produzir indóis no final da fase logarítmica. Houve efeito da adição de diferentes concentrações de triptofano ao meio de cultivo no aumento da produção de indóis até o nível de 200  $\mu\text{M}$ . Nas estirpes de *Azospirillum*, as formas de N:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  estimularam a produção de indóis em níveis baixos. A adição de  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{KNO}_2$  inibiu a produção de indóis em todas as bactérias testadas e no crescimento de células de *Azospirillum*. Os efeitos da inoculação foram também comparados com concentrações crescentes do ácido 3-indolacético,  $\text{KNO}_3$  e triptofano. Em condições axênicas, a elevada produção de indóis reduz o comprimento das raízes e colmos na presença de triptofano, especialmente quando submetidas à inoculação de *Azospirillum*.

Termos para indexação: bactérias diazotróficas, ácido 3-indolacético, fitormônios, fixação biológica de nitrogênio.

## Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* on production of indolic compounds and growth of wheat and rice seedlings

Abstract – Nitrogen fixing bacteria can contribute to plant growth by the production of auxin. The objectives of this work were to quantify the production of plant growth hormones by different nitrogen-fixing bacteria and to evaluate the effect of this inoculation on growth of wheat and rice seedlings. All strains tested produced indoles during the late logarithmic phase. Increasing the amount of tryptophan in the medium enhanced the production of indoles by the bacteria up to the level of 200  $\mu\text{M}$ . For the *Azospirillum* strains studied, the nitrogen sources:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  stimulated indoles production in low levels. The addition of  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  and  $\text{KNO}_2$  inhibited the production of indole compounds for all bacteria tested as well as the *Azospirillum* growth. The effects of inoculation were also compared to those caused by increased concentrations of IAA,  $\text{KNO}_3$  and tryptophan alone. In vitro conditions, the high amounts of indoles produced by the bacteria reduce the length of roots and stems in the presence of tryptophan, especially in the case of *Azospirillum* strains.

Index terms: diazotrophic bacteria, indole-3-acetic acid, phytohormones, biological nitrogen fixation.

### Introdução

Durante a última década, várias bactérias capazes de reduzir  $\text{N}_2$  foram descritas, sendo o gênero *Azospirillum* o mais estudado. Atualmente, este grupo engloba seis espécies diazotróficas, como o *A. brasilense* e o *A. lipoferum*. Além disso, algumas espécies foram descritas como endófitas porque não são capazes de sobreviver por longos períodos no solo (Baldani et al., 1997).

A primeira espécie endófitas a ser identificada foi o *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986), apesar de na época este fato não ter sido reconhecido. Posteriormente, outros membros do gênero foram incluídos como o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Baldani et al., 1996), *Herbaspirillum frisingense* (Kirchhof et al., 2001) e a última descrição apresentou uma espécie isolada de nódulos de feijão coabitando com o Rizóbio, o *Herbaspirillum lusitanum* (Valverde et al., 2003).

A produção de fitormônios por bactérias é um dos fatores responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento de plantas, como no caso da inoculação de estirpes de *Azospirillum* (Bottini et al., 1989). Vários experimentos foram realizados com estirpes deste gênero e mostraram potencial em promover crescimento de plantas em diferentes solos e condições climatológicas (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994). O principal hormônio produzido por estirpes de *Azospirillum* é uma auxina, o ácido 3-indolacético (AIA) (Crozier et al., 1988), além de outros compostos indólicos. Também produzem citoquininas (Cacciari et al., 1989) e giberelinas (Bottini et al., 1989). Quanto ao gênero *Herbaspirillum*, Bastián et al. (1998) detectaram a presença de AIA e giberelinas A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> em culturas de *Herbaspirillum seropedicae* e Radwan et al. (2002) constataram a produção de indóis por estirpes de *Herbaspirillum*, incluindo *H. rubrisubalbicans* e outros isolados não identificados.

Pelos menos três vias biossintéticas foram descritas na produção de AIA em *Azospirillum*: duas dependentes de triptofano, como a via indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA), e uma outra independente de triptofano (Dobbelaere et al., 1999; Lambrecht et al., 2000). Recentemente foi revelado que a enzima indole-3-piruvato decarboxilase, codificada pelo gene *ipdC*, é comum às duas vias IpyA, e à via que independe de triptofano, cujo precursor ainda é desconhecido, sendo possível que ambas tenham início em um intermediário comum, o IpyA (Lambrecht et al., 2000).

Novos resultados baseados na expressão de genes mostraram a regulação do gene *ipdC* por AIA em *A. brasilense* (Vande Broek et al., 1999) e observou-se que o promotor possui um elemento responsivo a auxina (AuxRE) similar ao promotor de genes que induzem auxinas em plantas (Lambrecht et al., 2000). Há evidências de que os microrganismos podem selecionar uma via metabólica diferenciada, dependendo do meio ambiente (Patten & Glick, 1996). Fato similar foi observado em espécies de *Rhizobium* que só utilizavam a via do indole-3-acetamida quando associados ao hospedeiro (Costacurta & Vanderleyden, 1995) e a via do ácido 3-indole-piruvico era utilizada em vida livre (Ernstsen et al., 1987).

Os objetivos deste trabalho foram quantificar a produção de hormônios de crescimento por estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio e avaliar o efeito da inoculação destas estirpes em plântulas de milho e trigo.

## Material e Métodos

Foram utilizadas neste estudo as estirpes *Azospirillum brasilense* Cd, *A. lipoferum* Br17, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *H. rubrisubalbicans* M4 e *Herbaspirillum* sp. 34 isolada de arroz (34-arroz), todas depositadas na coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, Município de Seropédica, RJ. Os experimentos foram conduzidos em recipientes de vidro (12 mL) contendo 5 mL de meio de cultivo semi-sólido NFb sem adição de N (Döbereiner, 1995), e os compostos indólicos foram medidos utilizando-se o método colorimétrico. Na formulação do meio de cultivo NFb, foi omitido o uso do indicador azul de bromotimol e das vitaminas para não haver interferências destes compostos na formação da reação colorimétrica. As fontes de N dissolvidas no tampão do meio de cultivo foram adicionadas por filtração (Millipore™ - 0,2 µm) após autoclavagem. Cada estirpe foi desenvolvida em erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo DYGS por 48 horas a 30°C. Este meio de multiplicação tem a seguinte composição (g L<sup>-1</sup>): glucose, 2; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5; ácido glutâmico, 1,5; água destilada para completar 1.000 mL e pH final ajustado para 6,8. Como inóculo dos testes, foi usado 100 µL de células centrifugadas por três vezes a 10.000 g por 15 min a 4°C, utilizando tampão fosfato 0,06 M (estéril) com pH ajustado para 6,8 e suspenso em 30 mL do mesmo tampão. As culturas líquidas com *A. brasilense* e *A. lipoferum* foram incubadas a 35°C, e com *Herbaspirillum* spp., a 35°C, durante 48 horas em mesa agitadora a 125 rpm. Os ensaios usando meio semi-sólido NFb foram mantidos estáticos nas mesmas condições.

Para verificar o efeito de doses crescentes de triptofano, utilizou-se o meio de cultivo NFb acrescido das seguintes doses (µM): 12,5, 50, 100, 250, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 (acrescidas por filtração após a autoclavagem do meio). Foram avaliadas sete fontes de N: NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KNO<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub> e NaNO<sub>3</sub>. Cada fonte foi testada nas concentrações 0,2, 0,5 e 1,0 g L<sup>-1</sup>. Após filtração utilizando filtro Millipore™ (0,2 µm), os sais foram adicionados separadamente ao meio, e o controle recebeu o mesmo volume de água destilada estéril.

A concentração de compostos indólicos foi estimada no sobrenadante das culturas após a inoculação. As células foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min a 4°C, usando todo o conteúdo dos vidros. Como vários

compostos indólicos, além do AIA, podem ser medidos pelo método colorimétrico, o termo 'compostos indólicos' foi adotado referindo-se às auxinas deste grupo (Crozier et al., 1988). O método colorimétrico usado foi o descrito por Gordon & Weber (1951) e modificado por Minamisawa et al. (1992). A concentração dos compostos indólicos foi estimada previamente usando a curva padrão obtida pela adição de quantidades conhecidas de AIA (Sigma): 25, 50, 100, 150, 200, 300  $\mu\text{M}$ . A quantidade de indóis produzidos foi expressa pelo valor obtido na curva de AIA ( $\mu\text{M}$ ) e dividido pela biomassa de células (células secas em mg). Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Para medir o crescimento celular no meio de cultivo semi-sólido, foi utilizada a massa das células secas. O conteúdo dos frascos de 5 mL foi filtrado em papel Whatman<sup>TM</sup> (Ashless grade 42; 185 mm de diâmetro) e o resíduo foi secado a 60°C até que atingisse massa constante. O crescimento foi medido pela subtração do controle, com 100  $\mu\text{L}$  de água destilada.

Os experimentos de inoculação foram conduzidos com sementes de trigo (*Triticum sativum* cv. BEM16) e arroz (*Oryza sativa* cv. IR42) desinfestadas superficialmente. As sementes de trigo foram desinfestadas com álcool 70% por 10 min, seguido do tratamento com  $\text{HgCl}_2$  (0,1%) dissolvido em HCl (0,05 N) por 10 min. Em seguida, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada estéril. Na germinação, foram colocadas dez sementes por placa contendo meio de cultivo Agar Nutritivo (Vetec), durante 72 horas em câmara de crescimento a 30°C. Sementes de arroz foram desinfestadas por imersão em álcool absoluto por 1 min, colocadas para agitar a 125 rpm por 1 hora em solução de hipoclorito de sódio (5%) e em seguida lavadas cinco vezes com água destilada estéril. As sementes foram colocadas para germinar nas mesmas condições citadas, três dias antes do transplantio. As sementes das duas gramíneas, que não apresentaram contaminação, foram transferidas para tubos de vidro de 20x3 cm contendo 50 mL de meio de cultivo NFb preparado conforme Barbieri et al. (1986). Na inoculação utilizaram-se as cinco estirpes, além da estirpe mutante 245 Nif<sup>-</sup> da espécie *Azospirillum brasilense*, mas que produz AIA (Katzy et al., 1995). Todas as estirpes foram desenvolvidas no meio citado e lavadas com tampão fosfato. Cada tubo de vidro contendo uma semente germinada recebeu a inoculação de 2 mL da suspensão de bactérias com a densidade ótica ajustada para  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$

de tampão fosfato. O efeito da inoculação na produção de indóis foi comparado com uma dose de L-triptofano (100 mg  $\text{L}^{-1}$  adicionado por filtragem no meio), doses crescentes de AIA (50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ ), 0,5 g  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  e 2 mL de água estéril, usada como controle.

Nas plantas, avaliou-se a massa de raízes e da parte aérea e o comprimento das raízes e da parte aérea. A superfície das raízes foi estimada conforme Carly & Watson (1966). A contagem das bactérias inoculadas foi feita pelo método da diluição serial, seguida de inoculação de 100  $\mu\text{L}$  em meio de cultivo batata com três repetições (Döbereiner, 1995). O crescimento do mutante 245 Nif<sup>-</sup> foi estimado pelo método de diluição seriada (1/10), inoculando-se as três últimas diluições (100  $\mu\text{L}$ ) sobre o meio de cultivo NFb sólido suplementado com extrato de levedura (100 mg  $\text{L}^{-1}$ ). Os tubos de vidro foram distribuídos em blocos ao acaso com 12 repetições. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de DMS (diferença mínima significativa) a 1% de probabilidade. A análise estatística foi realizada pelo programa MSTATC.

### Resultados e Discussão

Os compostos indólicos produzidos por todas as estirpes correlacionaram-se com a massa das células secas (Tabela 1). O aumento da acumulação dos compostos indólicos no meio de cultivo semi-sólido ocorreu predominantemente durante a fase estacionária. Na ausência de N, *A. brasilense* (estirpe Cd) aumentou 3,8 vezes a produção de indóis em 24 horas e este acúmulo não foi alcançado pelas outras estirpes testadas (Br17 – 2,48; Z67 – 1,75; M4 – 2,97 e 34-arroz – 0,89) (Tabela 1). As estirpes de *Azospirillum* produziram de três a sete vezes mais compostos indólicos (entre 300 a 500  $\mu\text{M}$ ) que as de *Herbaspirillum*. Como observado por Baca et al. (1994), as estirpes excretaram indóis na fase estacionária, que foi atingida 24 horas após a inoculação, usando meio de cultivo líquido suplementado com 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de triptofano. Utilizando-se cultivo semi-sólido, o máximo de acúmulo ocorreu 48 horas após a inoculação.

Aumentando a concentração de triptofano no meio, todas as estirpes mostraram resposta linear na produção de indóis até o nível de 200  $\mu\text{M}$  em meio de cultivo semi-sólido (Tabela 2). Entre as estirpes de

*Herbaspirillum*, o isolado 34-arroz respondeu à adição de triptofano, aumentando seis vezes a produção de indóis na presença de 200  $\mu\text{M}$  de triptofano e superando as demais (Tabela 2). Esse efeito estimulatório pode ter sido causado pelo triptofano – precursor da biossíntese de AIA por estas bactérias –, aumentando o crescimento celular ou sendo consumido como fonte de N (onde a sua concentração não excede os níveis inibitórios), estimulando as multiplicações celulares, resultando em maior crescimento e maior atividade da nitrogenase (Tien et al., 1979).

Quanto à adição de diversas fontes de N na forma de amônio e nitrato no meio de cultivo semi-sólido, utilizando três concentrações diferentes, foi observado que o N aplicado na forma de íons amônio exibiu um efeito positivo na produção de indóis, quando comparado ao uso de formas de nitrato por estirpes de *Azospirillum* (Cd e Br17) (Tabela 3). No controle sem adição de N, pode-se observar que a produção de indóis não foi afetada nas estirpes de *Azospirillum*. Por sua vez, as estirpes de *Herbaspirillum* apresentaram efeito positivo ao aumento das concentrações de sais de amônio, especialmente na presença de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e o oposto ocorreu com as estirpes de *Azospirillum* testa-

das. No tratamento usando nitrato como fonte de N, a atividade de produção de indóis só foi positiva em um único caso: *A. brasilense* Cd se desenvolvendo na presença de 200  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ , com incremento de 4%.

Baca et al. (1994) também constataram que a produção de AIA na presença de  $\text{KNO}_3$  (10 mM) foi de duas a dez vezes maior que a produzida em meio contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (18 mM) por três estirpes testadas (*A. lipoferum* UAP06, *A. brasilense* Az30-INTA e H18) e que o oposto ocorreu com a estirpe UAP14 de *A. brasilense*. Hartmann et al. (1983) descreveram um aumento de dez vezes na produção de AIA em *A. brasilense* pela adição de amônio. As estirpes de *Azospirillum* reduziram a produção de AIA com a adição de doses crescentes de sais de amônio (de 3,7 a 18,7 mM no caso de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Infere-se, portanto, que o gênero *Herbaspirillum* possui um caminho metabólico diferente ou menos eficiente para a produção de indóis que o apresentado por *Azospirillum*, resultando em uma produção bem menor de auxinas mensuradas por esse método.

Fatores como concentração do precursor (triptofano), presença de múltiplos genes regulatórios em diferentes vias metabólicas e também a concentração elevada do produto final (AIA), podem concorrer para a regulação

**Tabela 1.** Atividade específica da produção de indóis ( $\mu\text{M mg}^{-1}$  de células secas) por cinco estirpes de bactérias diazotróficas, usando meio de cultivo semi-sólido NFb suplementado com triptofano<sup>(1)</sup>.

Estirpes	Dias após a inoculação													
	1		2		3		4		5		6		7	
	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N
Cd	1,05	2,13	4,05	3,40	5,99	5,05	6,64	5,45	7,35	5,34	7,93	5,35	8,66	4,81
Br17	0,63	1,53	3,79	3,11	7,48	3,64	7,25	3,96	8,22	4,77	8,73	5,94	9,75	5,38
Z67	0,64	0,61	1,12	1,24	1,11	1,63	1,00	1,51	0,98	1,36	0,83	1,50	0,67	1,48
M4	0,37	1,19	1,10	1,41	0,98	1,67	0,89	1,64	0,75	1,83	0,77	1,85	0,77	1,87
34-arroz	1,15	1,45	1,03	2,22	1,02	2,12	0,91	2,15	0,84	1,83	0,77	1,92	0,71	1,95
DMS (1%)	0,16		0,22		0,47		0,58		0,16		0,20		0,77	

<sup>(1)</sup>Nitrogênio suplementado na forma de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , na concentração de 1  $\text{g L}^{-1}$ ; médias de três repetições.

**Tabela 2.** Efeito de concentrações de triptofano ( $\mu\text{M}$ ) na atividade específica da produção de indóis por cinco estirpes de bactérias diazotróficas, usando meio NFb semi-sólido<sup>(1)</sup>.

Estirpes	Triptofano ( $\mu\text{M mg}^{-1}$ de células secas)										DMS
	0,0	12,5	25	50	100	200	500	1.000	1.500	2.000	
Cd	0,05	2,71	4,65	6,38	8,64	12,55	8,54	5,11	3,72	3,25	0,81
Br17	0,04	1,38	3,51	5,87	8,02	10,41	7,33	4,38	2,42	1,90	0,77
Z67	0,00	0,13	0,27	0,43	0,54	1,42	1,03	0,88	0,83	0,77	0,59
M4	0,00	0,16	0,22	0,33	0,61	1,44	1,04	0,87	0,83	0,77	0,58
34-arroz	0,00	0,19	0,25	0,35	0,56	3,39	2,76	2,31	2,15	2,13	0,65

<sup>(1)</sup>Médias de três repetições.

do metabolismo de AIA (Lambrecht et al., 2000). Carreño-Lopez et al. (2000) constataram que mudanças na fonte de carbono usada pela bactéria *A. brasilense* estirpe Sp7, mutante na produção de indóis, quando desenvolvida na presença de malato ou gluconato (na presença de triptofano) foi pouco afetada pela fonte de carbono, revelando que existia uma via alternativa e dependente de triptofano (as vias IPCD - indol-3-piruvato decarboxilase e a TAM - triptamina), como também uma via alternativa que usa o indol-3-acetonitrila (IAN) como um intermediário, sendo controlado pela repressão catabólica.

A inoculação de todas as estirpes nas duas gramíneas induziu efeito similar aos observados pela adição de AIA em meio de cultivo suplementado com triptofano. O comprimento das raízes de trigo e a superfície total (área radicular) foram reduzidos pela inoculação de *Azospirillum*, mesmo com a inoculação do mutante não fixador (245 Nif<sup>-</sup>) (Tabela 4). Por sua vez, os isolados de *Herbaspirillum* spp., que produziram menores quantidades de indóis medidos tanto por colorimetria como por HPLC (Radwan et al., 2002), induziram efeitos similares à adição de 100 µM de AIA, tanto na superfície

radicular como no comprimento da raiz e parte área (Tabelas 4 e 5). Em todos os casos, o alongamento radicular estava diretamente relacionado à produção de AIA, sendo que este parâmetro pode ser usado como um bioensaio para quantificar a produção desta auxina.

A inoculação de bactérias produziu efeitos similares à adição de KNO<sub>3</sub>, induzindo a formação de raízes com maior número de pêlos radiculares e maior massa e superfície (Tabelas 4 e 5). Como observado no trigo, a adição de triptofano ao meio de cultivo juntamente com a bactéria, reduziu o comprimento e a massa e área radicular nas plântulas de arroz, especialmente com as estirpes Cd e Br17 de *Azospirillum*, em relação ao controle (água), e esta inibição foi comparável à adição de 250 µM de AIA (Tabela 5).

Células de raízes são mais sensíveis à adição de auxina que células de parte aérea. Vários autores também mostraram que a inoculação de *Azospirillum* e a aplicação de hormônios induzem a proliferação de raízes laterais e pêlos radiculares (Glick, 1995). El-Khawass & Adachi (1999) usaram concentrações crescentes do sobrenadante de células de *A. brasilense* e *Klebsiella pneumoniae* em raízes de arroz e observaram que o

**Tabela 3.** Efeito de fontes de N na atividade específica da produção de indóis (µM mg<sup>-1</sup> de células secas) por cinco estirpes de bactérias diazotróficas, usando meio de cultivo semi-sólido NFb suplementado com triptofano<sup>(1)</sup>.

Fonte de N	N (mg L <sup>-1</sup> )	Cd	Br17	Z67	M4	34-arroz
Controle	0,0	8,82	8,60	0,69	0,81	0,78
NH <sub>4</sub> Cl	200	8,70	8,51	0,72	1,10	1,17
	500	5,87	5,60	1,10	1,52	1,54
	1.000	3,43	4,51	1,36	1,85	1,93
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	8,72	9,73	0,65	1,04	0,78
	500	5,04	4,20	0,87	1,26	1,37
	1.000	3,09	3,29	1,40	1,45	1,70
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	9,07	8,12	0,69	0,46	0,38
	500	5,82	6,23	0,71	0,91	0,57
	1.000	3,07	5,04	0,78	1,21	0,89
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	200	9,61	5,93	0,39	0,38	0,77
	500	5,59	2,21	0,03	0,00	0,00
	1.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NaNO <sub>3</sub>	200	7,97	5,95	0,48	0,40	0,65
	500	4,11	1,70	0,19	0,00	0,00
	1.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KNO <sub>3</sub>	200	9,27	6,13	0,49	0,55	0,68
	500	5,28	2,53	0,17	0,00	0,00
	1.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KNO <sub>2</sub>	200	0,00	0,00	0,44	0,40	0,59
	500	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00
	1.000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<sup>(1)</sup>Os valores de DMS foram de 0,83, 0,72 e 0,66, respectivamente, nas doses de 200, 500 e 1.000 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio; médias de três repetições.

**Tabela 4.** Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas no crescimento de plântulas de trigo<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Comprimento da raiz (cm)	Massa da raiz (mg)	Área radicular (cm <sup>2</sup> )	Contagem de bactérias (UFC g <sup>-1</sup> de raiz)	Comprimento da parte aérea (cm)	Massa da parte aérea (mg)
Com triptofano (100 mg L <sup>-1</sup> )						
Cd	1,08	35,7	0,051	3,0.10 <sup>8</sup>	16,21	110,0
Br17	1,11	34,9	0,058	3,0.10 <sup>8</sup>	16,07	109,0
Z67	17,22	31,5	0,148	3,0.10 <sup>7</sup>	19,78	128,0
M4	18,09	31,1	0,151	3,0.10 <sup>6</sup>	19,75	125,0
34-arroz	11,25	32,5	0,145	3,0.10 <sup>7</sup>	19,97	127,0
245 Nif	2,07	33,5	0,075	8,0.10 <sup>8</sup>	16,31	121,0
Sem triptofano						
Cd	21,67	31,8	0,144	3,0.10 <sup>7</sup>	21,09	118,0
Br17	22,13	30,7	0,140	3,0.10 <sup>6</sup>	20,01	111,0
Z67	22,71	29,1	0,128	3,0.10 <sup>6</sup>	19,13	98,0
M4	22,93	29,8	0,129	1,0.10 <sup>6</sup>	19,10	97,0
34-arroz	21,93	30,3	0,139	3,0.10 <sup>6</sup>	19,98	109,0
245 Nif	23,07	29,3	0,129	6,0.10 <sup>4</sup>	17,54	87,0
Meio de cultivo sem inoculação						
IAA 50 µM	16,09	35,2	0,152	0,0	21,03	136,0
AIA 100 µM	15,12	34,7	0,149	0,0	20,71	133,0
AIA 250 µM	2,13	21,3	0,138	0,0	13,02	98,0
AIA 500 µM	0,02	17,8	0,101	0,0	10,08	69,0
KNO <sub>3</sub>	16,80	32,1	0,148	0,0	21,02	135,0
Triptofano	12,02	30,1	0,138	0,0	18,61	112,0
Água	23,80	29,1	0,127	0,0	17,50	91,0
DMS (1%)	5,27	19,7	0,017	9,8.10 <sup>5</sup>	7,74	21,0

<sup>(1)</sup>Médias de 12 repetições.**Tabela 5.** Efeito da inoculação de cinco estirpes de bactérias diazotróficas no crescimento de plântulas de arroz<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Comprimento da raiz (cm)	Massa da raiz (mg)	Área radicular (cm <sup>2</sup> )	Contagem de bactérias (UFC g <sup>-1</sup> de raiz)	Comprimento da parte aérea (cm)	Massa da parte aérea (mg)
Com triptofano (100 mg L <sup>-1</sup> )						
Cd	0,55	26,8	0,031	4,0.10 <sup>8</sup>	7,20	29,0
Br17	0,65	27,9	0,029	8,0.10 <sup>7</sup>	7,05	28,0
Z67	3,35	29,5	0,028	6,0.10 <sup>7</sup>	9,78	31,0
M4	6,65	31,1	0,032	7,0.10 <sup>6</sup>	10,05	32,0
34-arroz	2,65	29,9	0,030	6,0.10 <sup>7</sup>	14,90	58,0
245 Nif	1,35	28,7	0,030	9,0.10 <sup>8</sup>	8,31	31,0
Sem triptofano						
Cd	9,95	32,8	0,043	8,0.10 <sup>7</sup>	11,55	35,0
Br17	4,35	30,7	0,040	6,0.10 <sup>6</sup>	12,05	37,0
Z67	10,05	32,1	0,044	5,0.10 <sup>6</sup>	12,25	35,0
M4	4,65	29,8	0,039	3,0.10 <sup>6</sup>	9,15	32,0
34-arroz	9,95	31,3	0,045	5,0.10 <sup>6</sup>	13,95	39,0
245 Nif	5,95	30,2	0,038	9,0.10 <sup>5</sup>	9,85	36,0
Meio de cultivo sem inoculação						
AIA 50 µM	1,25	32,2	0,036	0,0	5,05	39,0
AIA 100 µM	0,95	30,7	0,029	0,0	4,75	33,0
AIA 250 µM	0,65	20,3	0,021	0,0	4,02	28,0
AIA 500 µM	0,35	17,8	0,016	0,0	3,08	26,0
KNO <sub>3</sub>	10,05	32,9	0,048	0,0	15,05	61,0
Triptofano	1,35	30,1	0,032	0,0	7,65	34,0
Água	13,35	29,1	0,037	0,0	14,50	35,0
DMS (1%)	4,90	16,1	0,015	9,4.10 <sup>2</sup>	5,73	14,0

<sup>(1)</sup>Médias de 12 repetições.

comprimento e área radicular, massa de matéria fresca e seca foram estimuladas.

### Conclusões

1. A produção de indóis aumenta até a dose de 200 µM de triptofano.
2. Nas estirpes de *Azospirillum*, as fontes NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> estimulam a produção de indóis em baixas concentrações e a adição das fontes KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub>, KNO<sub>2</sub> inibe a produção de indóis nas bactérias e reduz a multiplicação de células de *Azospirillum*.
4. O efeito da inoculação das estirpes avaliadas, especialmente do *Azospirillum*, reduz o comprimento das raízes e colmos na presença de triptofano.

### Agradecimentos

Ao programa Pronex II/FINEP e à Faculdade de Ciência do Cairo, pela ajuda financeira ao projeto e bolsa de estudo do primeiro autor, respectivamente.

### Referências

- BACA, B.E.; SOTO-URZUA, L.; XOCHIHUA-CORONA, Y.G.; CUERVO-GARCIA, A. Characterization of two aromatic amino acid aminotransferases and production of indole acetic acid in *Azospirillum* strains. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.57-63, 1994.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.V.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.802-810, 1996.
- BARBIERI, P.; ZANELLI, T.; GALLI, E.; ZANELLI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v.36, p.87-90, 1986.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R.P. Identification of gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> and iso-A<sub>3</sub> in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.
- CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v.115, p.151-153, 1989.
- CARLY, H.E.; WATSON, R.D. A new gravimetric method for estimating root-surface areas. **Soil Science**, v.102, p.289-291, 1966.
- CARREÑO-LOPEZ, R.; CAMPOS-REALES, N.; ELMERICH, C. Physiological evidence for different regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. **Molecular and General Genetics**, v.264, p.521-530, 2000.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, p.1-18, 1995.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v.212, p.155-164, 1999.
- DÖBEREINER, J. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. In: ALEF, K.; NANNIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic, 1995. p.134-141.
- EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.377-381, 1999.
- ERNSTSEN, A.; SANDBERG, G.; CROZIER, A.; WHEELER, C.T. Endogenous indóis and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*. **Planta**, v.171, p.422-428, 1987.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117, 1995.
- GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192-195, 1951.

- HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterisation of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.916-923, 1983.
- KATZY, E.I.; PETROVA, L.; BORISOV, I.; PANASENKO, V.I. Genetical aspects of indole acetic acid production in *Azospirillum brasilense* Sp 245. In: DEL GALLO, M.; FENDRIK, I. (Ed.). ***Azospirillum VI and related microorganisms***: Genetics, physiology, ecology. Berlin: Springer, 1995. p.113-119. (NATO ASI Series. Series G, Ecological Sciences, 37).
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.157-168, 2001.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.
- MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2832-2839, 1992.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.
- RADWAN, T. EL-S. EL-D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v.32, p.39-54, 2002.
- TIEN, T.M.; GASKINS, 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**, v.37, p.1016-1024, 1979.
- VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.-M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1979-1983, 2003.
- VANDE BROEK, A.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.1338-1342, 1999.

---

Recebido em 2 de abril de 2004 e aprovado em 7 de julho de 2004