

Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo

Valéria Marino Rodrigues Sala⁽¹⁾, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso⁽²⁾, José Guilherme de Freitas⁽³⁾
e Adriana Parada Dias da Silveira⁽⁴⁾

⁽¹⁾Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq), Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: vmrsala@esalq.usp.br
⁽²⁾Esalq, Dep. de Ciência do Solo. E-mail: ejbncard@esalq.usp.br ⁽³⁾Instituto Agronômico (IAC), Centro de Grãos e Fibras, Caixa Postal 28, CEP13010-970 Campinas, SP. E-mail: jfreitas@iac.sp.gov.br ⁽⁴⁾IAC, Centro de Solos e Recursos Ambientais. E-mail: apdsil@iac.sp.gov.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições de campo, o efeito e a viabilidade econômica da inoculação de novos isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas, sob diferentes doses de nitrogênio, em dois genótipos de trigo, em duas localidades. Foram utilizados: três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8, *Azospirillum brasilense*; IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*; IAC-HT-12, *Zoogloea ramigera*), dois genótipos de trigo (ITD-19 e IAC-370) e três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha⁻¹). No estádio de quatro folhas e no perfilhamento, foram avaliados a massa de matéria seca e o N acumulado na parte aérea. Na colheita, foram avaliados o teor de N, a massa de 1.000 sementes e a produtividade de grãos. A inoculação promoveu maior massa de matéria seca e N acumulado e aumentou a produtividade de grãos, principalmente na presença de adubo nitrogenado, com lucro para o agricultor. Entretanto, o maior aumento na produtividade de grãos foi obtido nas plantas do genótipo IAC-370, com o emprego do isolado IAC-HT-12, na ausência de N, que superou em 45% o tratamento testemunha. As respostas variaram em relação ao local de cultivo, o que sugere expressiva interação planta-bactéria-ambiente.

Termos para indexação: *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, adubação nitrogenada, produtividade de grãos.

Wheat genotypes response to inoculation of diazotrophic bacteria in field conditions

Abstract – The aim of this work was to evaluate, in field conditions, the effect and the economic viability of inoculation of new homologous strains endophytic diazotrophic bacteria, under different nitrogen doses on two wheat genotypes. Three strains of diazotrophic bacteria (IAC-AT-8, *Azospirillum brasilense*; IAC-HT-11, *Achromobacter insolitus*; IAC-HT-12, *Zoogloea ramigera*), two wheat genotypes (ITD-19 and IAC-370), and three levels of nitrogen fertilizer as urea (0, 60 e 120 kg ha⁻¹) were tested. Shoot dry matter and total shoot nitrogen were evaluated, at four leaves and at tillering stages. Nitrogen concentration in the grain, 1,000 grains weight and yield were evaluated at harvest. Plants with inoculation presented increases in dry matter, N accumulation and grain yield, especially in combination with N fertilizer, bringing profit to the farmer. However, the genotype IAC-370 showed the highest increase in grain yield with the strain IAC-HT-12 in the absence of added N, exceeding the uninoculated control by 45%. Responses to inoculation varied according to location, suggesting a complex interaction of plant, bacteria and the environment.

Index terms: *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, N fertilizer, grain yield.

Introdução

O trigo é a segunda cultura de grãos em produção em nível mundial. A intensificação das pesquisas tem gerado grandes avanços na produtividade do trigo no Brasil (Bissoto, 2004).

O nitrogênio constitui o macroelemento mais limitante na produtividade do trigo, pois determina o número de afilhos ou perfilhos, e é essencial na fase de formação dos nós, no início do alongamento. As plantas conseguem

utilizar apenas 50% do fertilizante nitrogenado, aplicado como adubo, e, metade é perdida via lixiviação e desnitrificação (Dobbelaere et al., 2002).

Somente as culturas do trigo, milho e arroz consomem aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados utilizados no mundo (Ladha et al., 2005). Portanto, em razão da extensa área ocupada pelos cereais, aproximadamente cinco vezes a das leguminosas, a fixação biológica (FBN) associada a essas culturas torna-se de extrema importância, mesmo

que apenas parte de suas necessidades de N possa ser suprida pela FBN.

Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas. Há consenso de que o genótipo da planta é o fator-chave para obtenção dos benefícios oriundos da fixação biológica do N₂, aliado à seleção de estirpes eficientes (Reis et al., 2000).

De acordo com Bashand & Levanony (1990), aumentos moderados, em torno de 20%, atribuídos à presença de bactérias diazotróficas endofíticas, seriam considerados comercialmente significativos na agricultura moderna. Em artigo de revisão, sobre 20 anos de inoculação de *Azospirillum* em experimentos de campo, os autores recomendam a implantação de um inoculante comercial, e concluem que é possível promover o aumento da produtividade em importantes culturas agrícolas, em diferentes solos e regiões climáticas. O sucesso da inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas foi obtido em 60 a 70% dos experimentos já realizados (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994). Apesar de muitos anos de pesquisa, ainda se observam respostas muito variáveis, o que mostra a importância e justifica a realização de experimentos de campo. A falta de reprodutibilidade dos resultados ocorre mesmo em ambientes mais controlados, como em casa de vegetação, o que limita a produção de um inoculante comercial (Dobbelaere et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições de campo, o efeito e a viabilidade econômica da inoculação de novos isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas, sob diferentes doses de N, em dois genótipos de trigo, em duas localidades.

Material e Métodos

Os experimentos de campo foram instalados em 2002: no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo/APTA, em Latossolo Vermelho eutrófico típico; e na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Mococa, do Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Nordeste Paulista, em Argissolo Vermelho eutrófico típico, ambos com irrigação por aspersão.

As adubações de P, K e micronutrientes foram feitas com base na tabela de recomendação de adubação, para a cultura do trigo irrigado para o Estado de São Paulo

(Raij et al., 1997), conforme as análises de solo dos experimentos (profundidade 0–20 cm). Características químicas do solo em Campinas: MO, 32 g dm⁻³; pH em CaCl₂ 5,4; P, 32 mg dm⁻³; Ca, 22, Mg, 9, H+Al, 28, soma de bases, 32 e CTC, 62 mmol_c dm⁻³; V% 52; B, 0,2, Cu, 6, Fe, 1, Mn, 31,2 e Zn, 1,6 mg dm⁻³. Em Mococa: MO, 28 g dm⁻³; pH em CaCl₂ 5,2; P, 56 mg dm⁻³; Ca, 36, Mg, 14, H+Al, 28, soma de bases, 55,3 e CTC, 83 mmol_c dm⁻³; V% 62; B, 0,18, Cu, 6, Fe, 19, Mn, 18,2 e Zn, 2,5 mg dm⁻³.

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas sub-subdivididas (1,2x24 m = 28,8 m²), com quatro repetições: na parcela, três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8, IAC-HT-11 e IAC-HT-12); na subparcela, dois genótipos de trigo (ITD-19, *Triticum durum* L. e IAC-370, *Triticum aestivum hard* L.); e na sub-subparcela, três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha⁻¹). O fertilizante nitrogenado teve aplicação parcelada, e foi adicionado 70% no plantio e 30% após 30 dias da semeadura. O genótipo ITD-19 é considerado um material ineficiente e responsivo ao uso do adubo nitrogenado; é ineficiente porque, na ausência de fertilizante nitrogenado, apresenta menor produção de grãos que a média da população, e responsivo porque apresenta aumento da produção de grãos em consequência do N adicionado ao solo. O genótipo IAC-370 é considerado eficiente e responsivo.

O espaçamento utilizado entre linhas foi de 0,15 m, com as dimensões do canteiro experimental de 4 m de comprimento e 1,2 m de largura.

Para o preparo dos inoculantes, os isolados foram repicados em meio de cultura líquido acrescido de N, tendo sido: NFb (IAC-AT-8) e JNFb (IAC-HT-11 e IAC-HT-12) (Döbereiner et al., 1995). As culturas cresceram sob agitação constante durante 24 horas. Foi utilizada turfa em pó como carreador, com 10⁹ células g⁻¹ de turfa, o que representou aproximadamente 30 mL de meio de cultura para 100 g de turfa. Para a contagem do número de bactérias, foram utilizados os meios NFb (IAC-AT-8) e JNFb (IAC-HT-11 e IAC-HT-12), ambos semi-sólidos e sem adição de nitrogênio. O inóculo foi misturado à semente no momento do plantio; foram utilizados 450 g ha⁻¹ de inóculo, aproximadamente 30% a mais que a quantidade recomendada para a cultura da soja. O plantio foi realizado mecanicamente.

Os isolados utilizados: IAC-AT-8 (*Azospirillum brasilense*, acesso no Genbank nº DQ386149), isolado

em meio NFb, idealizado para o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum*; IAC-HT-11 (*Achromobacter insolitus*, acesso no Genbank nº DQ386150) e IAC-HT-12 (*Zoogloea ramigera*, acesso no Genbank nº DQ389143), isolados em meio JNFb, idealizado para o isolamento de *Herbaspirillum*, obtidos de raízes desinfestadas superficialmente do genótipo de trigo ITD-19. Esses isolados foram selecionados em razão de seu desempenho positivo em experimento, em condições gnotobióticas (Sala et al., 2005), e em casa de vegetação com utilização de areia esterilizada como substrato (Sala, 2002).

No estágio de quatro folhas e no perfilhamento, foram colhidos, em cada parcela experimental, 50 cm lineares da parte aérea das plantas de uma das linhas centrais. A massa de matéria seca foi obtida após secagem das plantas em estufa a 60°C com circulação de ar. Posteriormente, procedeu-se à moagem e homogeneização, para determinação da concentração de N pelo método micro-Kjeldahl (Bremner, 1965). Por ocasião da colheita, foram avaliados: o teor de N nas sementes, a produtividade de grãos e a massa de 1.000 sementes.

Os dados obtidos foram analisados, estatisticamente, pelo programa SANEST, e foi feita a análise da variância seguida da comparação das médias pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Para comparação entre doses de nitrogênio, foram feitas regressões polinomiais.

Resultados e Discussão

No experimento realizado em Campinas, as plantas do genótipo IAC-370, no estágio de quatro folhas, não apresentaram aumento significativo da biomassa e no

acúmulo de N com a inoculação. No estágio de perfilhamento, com a adubação de cobertura realizada, e a dose de N completa, todos os isolados empregados promoveram aumento significativo da biomassa e houve um incremento no N acumulado com a adição de 60 kg ha⁻¹ de N, em relação ao tratamento testemunha (Tabelas 1 e 2). Nesse estágio, observou-se ajuste quadrático da biomassa, em relação às doses de N, adicionadas às plantas que receberam inóculo de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Entretanto, somente na presença do isolado IAC-HT-12, foi observada essa resposta, quando avaliada a quantidade acumulada de N.

As plantas do genótipo ITD-19, na presença do isolado IAC-HT-12, apresentaram aumento significativo da massa de matéria seca e N acumulado, nas doses 0 e 60 kg ha⁻¹ de N, em ambos os estádios avaliados (Tabelas 1, 2 e 3). No estágio de perfilhamento, houve ajuste linear em relação às doses de N adicionadas, na presença do isolado IAC-HT-12. A adição de alta dose de N causou interação positiva do genótipo ITD-19 com os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-12, o que reverteu em aumento no crescimento e acúmulo de N nas plantas desse genótipo.

No experimento realizado em Mococa, na avaliação da massa da matéria seca e do N acumulado, na parte aérea das plantas de trigo, no estágio de quatro folhas, não houve diferenças significativas entre os isolados utilizados e a testemunha em ambos os genótipos. Entretanto, no estágio de perfilhamento, as plantas do genótipo IAC-370, foram beneficiadas pela utilização do isolado IAC-HT-12, quando se adicionou nitrogênio, e elas apresentaram maior massa de matéria seca nas

Tabela 1. Massa de matéria seca da parte aérea de dois genótipos de trigo, no estágio de perfilhamento, do experimento de campo em Campinas, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de quatro repetições⁽¹⁾.

Genótipo/isolado	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Equação de regressão	R ²
	0	60	120		
	Massa de matéria seca (g m linear ⁻¹)				
IAC-370/8AT	97,03ab	127,83a	109,42a	y = 97,03 + 0,923x - 0,0068x ²	1,00
IAC-370/11HT	94,31ab	136,77a	116,84a	y = 94,31 + 1,227x - 0,0086x ²	1,00
IAC-370/12HT	79,73b	144,08a	107,18a	y = 79,73 + 1,916x - 0,014x ²	1,00
IAC-370/TEST	115,26a	94,07b	102,33a	ns	ns
ITD-19/8AT	117,20ab	105,18b	160,81a	y = 117 + 0,7583x + 0,0093x ²	1,00
ITD-19/11HT	96,84bc	115,31b	104,68b	ns	ns
ITD-19/12HT	130,20a	149,10a	162,62a	y = 131 + 0,2667x	0,98
ITD-19/TEST	77,88c	87,68b	118,58b	y = 74,363 + 0,3393x	0,92

⁽¹⁾ Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; as letras comparam os valores nas colunas, entre os isolados, dentro da mesma dose de N e do mesmo genótipo; os coeficientes de variação relativos a isolados, genótipos e doses foram 5,5, 8,0 e 16,6%, respectivamente.

doses de 60 e 120 kg ha⁻¹ de N, e aumento do N acumulado, na dose de 120 kg ha⁻¹, em relação ao tratamento testemunha (Tabelas 4 e 5). Em relação às doses de N empregadas, houve ajuste quadrático para todos os tratamentos utilizados, com um pico de produção de biomassa, em média de 100 kg ha⁻¹; entretanto, para N acumulado, o ajuste foi linear.

No genótipo ITD-19, sem adição de N, as plantas que não receberam inóculo apresentaram maior massa de matéria seca e N acumulado do que os tratamentos com bactérias diazotróficas, o que demonstra influência negativa da inoculação (Tabela 4). Já foi observado que na ausência de adubo nitrogenado a inoculação pode causar decréscimo na massa de matéria seca da parte aérea, em relação à testemunha (Didonet et al., 2000). O mesmo autor atribuiu esse efeito a um possível

aumento no crescimento das raízes, em relação à parte aérea e, também, já foi demonstrado que os isolados utilizados nesse experimento aumentaram o crescimento das raízes em condições gnotobióticas (Sala et al., 2005). Uma explicação para os benefícios causados por essas bactérias pode ser sua capacidade de síntese de fitormônios. As auxinas são os fitormônios mais comumente sintetizados por diversos grupos de microrganismos, dos quais o principal é o ácido indol acético (AIA), o que, inclusive, já foi observado em cultura pura de células de isolados de bactérias, pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Achromobacter* e *Zoogloea* (Tsavkelova et al., 2006).

Outra explicação é a de que as bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas não contribuem com quantidades suficientes de N₂ fixado,

Tabela 2. Nitrogênio acumulado de dois genótipos de trigo, no estágio de perfilhamento, do experimento de campo em Campinas, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de quatro repetições⁽¹⁾.

Tratamento	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Equação de regressão	R ²
	0	60	120		
	N acumulado (g m linear ⁻¹)				
IAC-370/8AT	1,290A	1,831A	1,705A	ns	ns
IAC-370/11HT	1,210A	1,784A	1,697A	y = 1,40 + 0,0035x	0,53
IAC-370/12HT	1,013A	1,867A	1,857A	y = 1,32 + 0,0041x	0,62
IAC-370/TEST	1,420A	1,521A	1,673A	y = 1,01 + 0,0214x - 0,0001x ²	1,00
ITD-19/8AT	1,479AB	1,366B	2,898A	y = 1,48 - 0,0157x + 0,0002x ²	1,00
ITD-19/11HT	1,326BC	1,692AB	1,870B	y = 1,36 + 0,0045x	0,96
ITD-19/12HT	1,782A	2,090A	2,508A	y = 1,7617 + 0,0061x	1,00
ITD-19/TEST	1,024C	1,319B	1,870B	y = 0,9783 + 0,007x	0,97

⁽¹⁾Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; as letras comparam os valores nas colunas, entre os isolados, dentro da mesma dose de N e do mesmo genótipo; os coeficientes de variação relativos a isolados, genótipos e doses foram 5,4, 13,3 e 16,8%, respectivamente.

Tabela 3. Massa de matéria seca e N acumulado na parte aérea no genótipo de trigo ITD-19, no estágio de quatro folhas, do experimento de campo em Campinas, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de quatro repetições⁽¹⁾.

Tratamento	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Equação de regressão	R ²
	0	60	120		
	Massa de matéria seca (g m linear ⁻¹)				
ITD-19/8AT	8,53B	9,86B	16,80A	y = 7,601 + 0,0688x	0,87
ITD-19/11HT	9,33B	9,80B	8,45B	ns	ns
ITD-19/12HT	12,86A	15,13A	10,46B	y = 2,865 + 0,0956x - 0,0009x ²	1,00
ITD-19/TEST	7,00B	8,13B	11,65B	y = 6,603 + 0,0387x	0,92
	N acumulado (g m linear ⁻¹)				
ITD-19/8AT	0,340BC	0,421B	0,815A	y = 0,341 - 0,0013x + 0,00004x ²	1,00
ITD-19/11HT	0,464AB	0,521AB	0,450B	ns	ns
ITD-19/12HT	0,538A	0,691A	0,476B	y = 0,538 + 0,0056x - 0,00005x ²	1,00
ITD-19/TEST	0,274C	0,394B	0,585B	y = 0,262 + 0,0026x	0,98

⁽¹⁾Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; as letras comparam os valores nas colunas, entre os isolados, dentro da mesma dose de N; para massa de matéria seca os coeficientes de variação relativos a isolados, genótipos e doses foram 6,7, 20,3 e 24,5%, respectivamente e para N acumulado foram 8,6, 16,0 e 25,5%, respectivamente.

para garantir produtividade máxima (Baldani & Baldani, 2005), e que a ausência de N pode representar um alto custo da associação para a planta, em condição de baixo nível de N no solo. Uma vez que essas bactérias são extremamente dependentes das fontes de carbono disponibilizadas pela planta, todos os fatores que a afetam influenciam as bactérias a ela associadas (Hallmann et al., 1997).

Quando foram adicionados 60 kg ha⁻¹ de N, nas plantas do genótipo ITD-19, o isolado IAC-HT-11 propiciou aumento da massa de matéria seca e N acumulado, tendo-se observado ajuste quadrático em relação às doses de N adicionadas, na presença do mesmo isolado (Tabelas 4 e 5). Já foi observado por Bertrand et al. (2000) que um isolado do gênero *Achromobacter*, obtido de plantas de canola,

estimulou o sistema de transporte de íons pelas raízes, o que proporcionou maior absorção de nitrogênio.

Em Campinas, as plantas do genótipo IAC-370 apresentaram aumento significativo da produção, na presença do isolado IAC-HT-12, nas doses 0 e 120 kg ha⁻¹ de N, e promoveram aumentos de aproximadamente 1.000 kg ha⁻¹ em ambas as situações, o que representa um incremento de 45 e 27% respectivamente, em relação à testemunha (Tabela 6). Porém, nesse genótipo não se tinha constatado efeito benéfico da inoculação sobre a biomassa, na presença desse isolado (Tabela 1). Entretanto, pode ter havido maior crescimento das raízes em relação à parte aérea, o que pode ter propiciado o aumento na produtividade, ou ainda, menor investimento em biomassa, em benefício do grão, como demonstrado por Didonet et al. (2000).

Tabela 4. Massa da matéria seca da parte aérea de dois genótipos de trigo, no estágio de perfilhamento, do experimento de campo em Mococa, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de quatro repetições⁽¹⁾.

Tratamento	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Equação de regressão	R ²
	0	60	120		
	Massa de matéria seca (g m linear ⁻¹)				
IAC-370/8AT	58,83AB	135,46B	143,05B	y = 58,83 + 1,852x - 0,009x ²	1,00
IAC-370/11HT	46,41B	129,68B	159,99AB	y = 46,41 + 1,829x - 0,007x ²	1,00
IAC-370/12HT	61,95AB	159,65A	174,06A	y = 61,96 + 2,322x - 0,011x ²	1,00
IAC-370/TEST	72,70A	129,85B	138,57B	y = 72,70 + 1,356x - 0,006x ²	1,00
ITD-19/8AT	44,02B	105,74B	143,69AB	y = 47,98 + 0,831x	0,98
ITD-19/11HT	50,49B	130,51A	129,45B	y = 50,49 + 2,009x - 0,011x ²	1,00
ITD-19/12HT	45,28B	102,89B	156,35A	y = 45,97 + 0,925x	0,99
ITD-19/TEST	81,59A	101,86B	145,18AB	y = 77,75 + 0,529x	0,96

⁽¹⁾Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; as letras comparam os valores nas colunas, entre os isolados, dentro da mesma dose de N e do mesmo genótipo; os coeficientes de variação relativos a isolados, genótipos e doses foram 7,7, 5,4 e 14,6%, respectivamente.

Tabela 5. Nitrogênio acumulado de dois genótipos de trigo, no estágio de perfilhamento, do experimento de campo em Mococa, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de quatro repetições⁽¹⁾.

Tratamento	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Equação de regressão	R ²
	0	60	120		
	N acumulado (g m linear ⁻¹)				
IAC-370/8AT	0,771A	1,819AB	2,453B	y = 0,840 + 0,014x	0,98
IAC-370/11HT	0,659A	1,649B	2,957A	y = 0,606 + 0,0191x	0,99
IAC-370/12HT	0,788A	2,066A	3,034A	y = 0,839 + 0,0187x	0,99
IAC-370/TEST	0,900A	1,676AB	2,166B	y = 0,948 + 0,0105x	0,98
ITD-19/8AT	0,481B	1,383AB	2,414A	y = 0,459 + 0,0161x	0,99
ITD-19/11HT	0,591B	1,757A	2,256A	y = 0,591 + 0,025x - 0,00009x ²	1,00
ITD-19/12HT	0,590B	1,519AB	2,622A	y = 0,561 + 0,0169x	0,99
ITD-19/TEST	1,074A	1,252B	2,348A	y = 1,074 - 0,005x + 0,00013x ²	1,00

⁽¹⁾Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; as letras comparam os valores nas colunas, entre os isolados, dentro da mesma dose de N e do mesmo genótipo; os coeficientes de variação relativos a isolados, genótipos e doses foram 6,7, 8,4 e 16,2%, respectivamente.

No genótipo IAC-370, na presença do isolado IAC-HT-12, a produtividade na ausência de N foi praticamente igual, com 60 kg ha⁻¹ de N, o que demonstra potencial de utilização desse isolado para economia do N aplicado. Também, na presença do isolado IAC-HT-12, observou-se que as quantidades de N empregadas não foram um fator limitante para obtenção de benefícios propiciados por esse isolado (Tabela 6).

Organismos do gênero *Zoogloea* são capazes de fixar N₂ e já foram isolados das raízes da gramínea *Leptochloa fusca* (Bilal & Malik, 1987), e foi o grupo predominantemente encontrado em plantas de arroz (Hashidoko et al., 2002). Também, já foi observado que um isolado de *Zoogloea* sp. aumentou a produtividade de grãos de duas variedades de arroz (Mirza et al., 2006).

Nas plantas da cultivar ITD-19, na dose de 120 kg ha⁻¹ de N, houve incremento de aproximadamente 400 kg na produtividade na presença do isolado IAC-HT-11, ganho de 10% em relação ao tratamento testemunha. Também, esse isolado promoveu maior produtividade do genótipo ITD-19, comparado ao genótipo IAC-370, em todas as doses de N empregadas (Tabela 6).

Independentemente da dose ou cultivar utilizada, a massa de 1.000 grãos foi influenciada pelo emprego dos isolados testados (Tabela 7), e as sementes das plantas com a inoculação apresentaram maior massa que as da testemunha, o que pode ter ocorrido em razão da melhor distribuição do N na planta e demonstra melhor aproveitamento da biomassa gerada, em benefício da produção de grãos (Didonet et al., 2000). O teor de N no grão não foi influenciado pelos isolados utilizados,

porém o isolado IAC-HT-12 promoveu maior quantidade acumulada de N (Tabela 7).

Na análise da produtividade, no experimento realizado em Mococa, no genótipo IAC-370 (Tabela 8), somente houve efeito benéfico da inoculação quando se adicionaram 120 kg ha⁻¹ de N, e os tratamentos com os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-11 foram superiores à testemunha, com aumento na produtividade de 20 e 26%, respectivamente. Observou-se regressão linear em relação às doses empregadas, na presença do isolado IAC-AT-8, enquanto os demais tratamentos tiveram ajuste quadrático, com ponto de máxima em torno de 100 kg ha⁻¹ de N.

No genótipo IAC-370, o emprego do isolado IAC-HT-12 não propiciou maior produtividade em relação ao tratamento testemunha, entretanto, como ocorrido no experimento realizado em Campinas (Tabela 6), na presença de adubo nitrogenado, esse genótipo foi mais beneficiado por esse isolado do que o genótipo ITD-19 (Tabela 8).

No genótipo ITD-19, assim como no IAC-370, na ausência de fertilizante nitrogenado, não houve efeito benéfico da inoculação para a produtividade de grãos. Porém, quando se adicionou N, na dose de 60 kg ha⁻¹, e se utilizaram os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-11, houve incremento de aproximadamente 20% na produtividade e, também, com a adição 120 kg ha⁻¹ de N e o isolado IAC-AT-8, houve incremento de 14% em relação à testemunha (Tabela 8).

No experimento realizado em Mococa, só se obteve aumento significativo na produtividade, em razão da inoculação, no genótipo IAC-370, com a adição de

Tabela 6. Produtividade de dois genótipos de trigo, do experimento de campo em Campinas, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de quatro repetições⁽¹⁾.

Tratamento	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Equação de regressão	R ²
	0	60	120		
	Produtividade (kg ha ⁻¹)				
IAC-370/8AT	2.024B	3.633A	3.905B	y = 2024 + 37,95x - 0,185x ²	1,00
IAC-370/11HT	2.267B	2.916B	2.885C	y = 2380 + 5,147x	1,00
IAC-370/12HT	3.450A	3.564A	4.518A	y = 3309 + 8,90x	1,00
IAC-370/TEST	2.385B	3.292AB	3.565B	y = 2490 + 9,83x	1,00
ITD-19/8AT	2.431B	3.606A	3.538B	y = 2430 + 29,95x - 0,173x ²	1,00
ITD-19/11HT	3.227A	3.538A	4.195A	y = 3169 + 8,064x	0,96
ITD-19/12HT	2.609B	3.897A	3.825AB	y = 2608 + 32,78x - 0,188x ²	1,00
ITD-19/TEST	3.230A	3.822A	3.823AB	y = 3328 + 4,94x	0,75

⁽¹⁾Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; as letras comparam os valores nas colunas, entre os isolados, dentro da mesma dose de N e do mesmo genótipo; os coeficientes de variação relativos a isolados, genótipos e doses foram 4,5, 9,7 e 10,8%, respectivamente.

120 kg ha⁻¹ de N, o que indica que altas doses de N não foram fator limitante para os efeitos benéficos causados por esses isolados. Outros fatores, como a produção de fitormônios, e não somente a FBN, podem ser responsáveis pelos benefícios propiciados por bactérias diazotróficas endofíticas (Baldani & Baldani, 2005). Existem poucos relatos dos benefícios causados por bactérias do gênero *Achromobacter*. Recentemente, foi observado que um isolado de *Achromobacter* proporcionou resistência à salinidade (Mayak et al., 2004a) e resistência ao estresse hídrico (Mayak et al., 2004b) em plantas de tomate.

A massa de matéria seca e o acúmulo de N na parte aérea, assim como a produtividade de grãos, não foram beneficiadas pelas bactérias diazotróficas, no tratamento sem adubação nitrogenada, no experimento realizado em

Mococa, uma vez que a inoculação geralmente não substitui a adubação nitrogenada na cultura do trigo (Zambre et al., 1984; Saubidet et al., 2002); a associação planta-bactéria pode ter representado um alto custo para a planta, ao não proporcionar benefícios nessa condição.

Apesar da produtividade mais baixa obtida em Mococa, em relação ao experimento instalado em Campinas, foi possível verificar benefícios provenientes da inoculação, tendo-se obtido aumentos de até 26% na produtividade, na maior dose de N utilizada. No Rio Grande do Sul, foram obtidos aumentos de no máximo 20%, em relação ao tratamento testemunha (Didonet et al., 1996) e, segundo Bashand & Levanony (1990), aumento de 20% já pode ser considerado comercialmente significativo.

O teor de N nas sementes, da mesma forma que no experimento realizado em Campinas, e a massa de mil sementes não foram influenciados pelo emprego dos isolados utilizados, o que indica que a produtividade foi determinada pela quantidade de grãos e não pela massa deles.

A inoculação pode ser considerada uma prática pouco onerosa para a cultura do trigo, uma vez que, com base no preço do inoculante na forma de turfa, utilizado para a cultura da soja, o valor gasto com a inoculação seria de R\$ 5,40 ha⁻¹. Ao se considerar o preço do trigo de R\$ 350,00 a tonelada (Companhia Nacional de Abastecimento, 2006), aumentos acima de 15,43 kg ha⁻¹ de grãos já justificariam a prática da inoculação.

Sabendo-se que o preço médio da tonelada da uréia é de R\$ 980,00 (preço médio praticado no mercado de Campinas, SP), e o do trigo é R\$ 350,00, pode-se estabelecer o limite em que o acréscimo no custo do N

Tabela 7. Massa de 1.000 grãos e N acumulado nos grãos, sob influência de três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e testemunha sem inoculação, independentemente do genótipo e da dose de N empregada, em Campinas, SP. Média de 24 repetições⁽¹⁾.

Isolado	Massa de 1.000 grãos (g)	N acumulado no grão (kg ha ⁻¹)
8AT	52,30A	70.251B
11HT	52,42A	69.333B
12HT	52,29A	80.713A
TEST	49,37B	72.561B

⁽¹⁾Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; para massa de 1.000 grãos os coeficientes de variação relativos a isolados, genótipos e doses foram 2,3, 8,5 e 5,3%, respectivamente, e para N acumulado foram 4,2, 10,6 e 14,2%, respectivamente.

Tabela 8. Produtividade de dois genótipos de trigo, do experimento de campo em Mococa, SP, no ano agrícola de 2002, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de quatro repetições⁽¹⁾.

Tratamento	Doses de N (kg ha ⁻¹)			Equação de regressão	R ²
	0	60	120		
	Produtividade (kg ha ⁻¹)				
IAC-370/8AT	1.004A	2.085B	2.639A	y = 1092 + 13629x	0,96
IAC-370/11HT	941A	2.277AB	2.746A	y = 940,5 + 29,50x - 0,120x ²	1,00
IAC-370/12HT	1.012A	2.264AB	2.554AB	y = 1012 + 28,86x - 0,1333x ²	1,00
IAC-370/TEST	1.033A	2.530A	2.209B	y = 1033 + 40,12x - 0,253x ²	1,00
ITD-19/8AT	1.025A	2.325A	2.508A	y = 1024 + 30,98x - 0,155x ²	1,00
ITD-19/11HT	1.023A	2.253A	2.068B	y = 1023 + 32,31x - 0,196x ²	1,00
ITD-19/12HT	919A	1.679B	2.042B	y = 983 + 9,358x	0,96
ITD-19/TEST	1.119A	1.940AB	2.204AB	y = 1211 + 9,04x	0,92

⁽¹⁾Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; as letras comparam os valores nas colunas, entre os isolados, dentro da mesma dose de N e do mesmo genótipo; os coeficientes de variação relativos a isolados, genótipos e doses foram 9,4, 11,8 e 14,5%, respectivamente.

aplicado é compensado pelo acréscimo na produtividade de grãos, ou seja, a produtividade máxima econômica (Nogueira, 1997), que corresponde à quantidade aplicada de N, que proporciona a máxima distância entre a linha de custo do insumo e a curva de resposta por unidade de área. Assim, a dose de N que proporciona o maior retorno econômico para o genótipo IAC-370, no experimento realizado em Campinas, seria de 120 kg ha⁻¹ de N, para o tratamento com o isolado IAC-HT-12 e, também, para o tratamento testemunha, uma vez que as respostas à adição de N foram lineares, com o emprego desses dois tratamentos, e os coeficientes lineares das equações ajustadas (Tabela 6) são maiores que a relação de preços entre a tonelada de trigo e da uréia. Ao se considerar o custo do inóculo de R\$ 5,40 ha⁻¹, obtem-se lucro de R\$ 328,00 ha⁻¹ com o emprego do isolado IAC-HT-12, em relação ao tratamento testemunha.

No experimento realizado em Mococa, ao ser calculada a produtividade máxima econômica, para o genótipo IAC-370, obteve-se que a dose de N que proporcionaria maior retorno econômico seria a de 120 kg ha⁻¹ de N, com o emprego do isolado IAC-AT-8, de 97 kg ha⁻¹ com o isolado IAC-HT-11, e de 67 kg ha⁻¹ para o tratamento testemunha, sendo que a produtividade obtida com a inoculação nas doses acima mencionadas não propiciariam lucro em relação ao tratamento testemunha. Entretanto, considerando-se somente a produtividade obtida na maior dose de N utilizada (120 kg ha⁻¹ de N), seriam obtidos lucros de R\$ 145,00 ha⁻¹ com o isolado IAC-AT-8 e de R\$ 182,00 ha⁻¹ com o isolado IAC-HT-11, em relação ao tratamento testemunha. As plantas na presença do isolado IAC-AT-8 produziram 4 kg de grãos acima da testemunha por quilo de N adicionado, e do isolado IAC-HT-11, 5 kg acima da testemunha, o que demonstra maior eficiência de utilização do N na maior dose utilizada.

Apesar de não ter sido observado efeito significativo da inoculação para produção de grãos, no genótipo ITD-19, por meio do cálculo da produtividade máxima econômica, observou-se que o agricultor obteria lucro com a inoculação em ambas as localidades. Com o emprego do isolado IAC-HT-11, no experimento realizado em Campinas, a dose que proporcionaria o maior retorno econômico também seria a de 120 kg ha⁻¹ de N, o lucro obtido com a inoculação seria de R\$ 125,00 ha⁻¹, em relação ao tratamento testemunha, nessa mesma dose de N. Em Mococa, a produtividade

máxima econômica seria obtida na dose de 80 kg ha⁻¹ de N, com o emprego do isolado IAC-AT-8, de 67 kg ha⁻¹ com o isolado IAC-HT-11 e de 120 kg ha⁻¹ na testemunha, e propiciaria um lucro de R\$ 187,00 e de R\$ 143,00 ha⁻¹, respectivamente, em relação à testemunha.

Um dos pontos cruciais para seleção e manejo desses diazotróficos é a especificidade planta-bactéria, conforme revisado por Baldani & Baldani (2005). No presente trabalho, foi observado que apesar desses isolados terem sido obtidos das raízes desinfestadas superficialmente do genótipo ITD-19 (Sala et al., 2005), somente no genótipo IAC-370 foi obtido aumento significativo da produtividade, com a inoculação em relação ao tratamento testemunha, e esse efeito se repetiu nas duas localidades estudadas.

Esse genótipo foi beneficiado pela inoculação, mesmo em altas doses de fertilizante nitrogenado, possivelmente, porque é altamente responsivo à adição de N e apresenta alto rendimento de grãos em condições favoráveis (Trigo..., 1999). Ainda, esse efeito pode ter ocorrido em consequência de uma melhor interação planta-bactéria diazotrófica, nessa condição, uma vez que os isolados utilizados foram obtidos de plantas de trigo na presença de adubação nitrogenada (Sala et al., 2005).

Existem relatos de benefícios oriundos da inoculação de *Azospirillum* em plantas de trigo, com a adição de fertilizante nitrogenado, que variam de 15 kg ha⁻¹ até aproximadamente 160 kg ha⁻¹ de N (Zambre et al., 1984; Didonet et al., 1996, 2000; Dalla Santa et al., 2004). Existem evidências de que em plantas de trigo a inoculação não substitui o adubo nitrogenado, porém, promove a melhor absorção e utilização do N disponível (Saubidet et al., 2002). Já foi observado que os isolados utilizados promovem aumento no crescimento das raízes de plantas de trigo, em condições gnotobióticas (Sala et al., 2005), e que o efeito estimulatório no desenvolvimento das raízes, nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta, pode ser responsável pelo efeito positivo da inoculação (Mertens & Hess, 1984). A maior absorção de N pelas raízes pode ocorrer em razão da produção, pela bactéria, de auxinas, citoquininas e giberelinas (Baldani & Baldani, 2005) e, ainda, graças ao aumento no número de raízes e pêlos radiculares (Dobbelaere et al., 1999), o que permite melhor exploração do solo e benefícios em condições de estresse hídrico em trigo (Creus et al., 2004).

Este é o primeiro trabalho que relata o efeito da inoculação, em campo, dos gêneros *Achromobacter*

e *Zoogloea*, em plantas de trigo, com resultados benéficos para essa cultura e aumento de sua produtividade.

Conclusões

1. Há aumento de produção com a inoculação de *Azospirillum*, *Achromobacter* e *Zoogloea* na cultura do trigo.
2. Não há especificidade dos genótipos de trigo empregados e essas novas bactérias endofíticas.
3. O local de cultivo influencia as respostas obtidas com a inoculação.
4. O maior incremento na produtividade de grãos é obtido na ausência de N adicional.
5. A inoculação proporciona maior rentabilidade à cultura do trigo.

Agradecimentos

À técnica Rosana Gierts Gonçalves, ao Centro Experimental Central do Instituto Agrônômico/Apta e à Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Mococa, pelo auxílio na realização dos experimentos de campo; à Capes pela bolsa de estudos concedida; à Fapesp, pelo auxílio ao projeto.

Referências

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.
- BASHAND, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.591-605, 1990.
- BERTRAND, H.; PLASSARD, C.; PINOCHET, X.; TOURAINE, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.229-236, 2000.
- BILAL, R.; MALIK, K. Isolation and identification of a N₂-fixing *Zoogloea*-forming bacterium from kallar grass histoplane. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.289-294, 1987.
- BISSOTO, V. Algumas considerações sobre a cultura do trigo. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 36., Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/rcsbpt04/index.htm>>. Acesso em: 18 maio 2007.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1149-1178.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/comercializacao/precos_com/precos_2006/COMU_406.doc>. Acesso em: 4 ago. 2006.
- CREUS, C.M.; SUELDO, R.J.; BARASSI, C.A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v.82, p.273-281, 2004.
- DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.843-850, 2004.
- DIDONET, D.A.; LIMA, O.S.; CANDATEN, M.H.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.401-411, 2000.
- DIDONET, D.A.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa de matéria seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.645-651, 1996.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A.V.; 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.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.284-297, 2002.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa- SPI; Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
- HASHIDOKO, Y.; TADA, M.; TAHARA, S. Soft gel medium solidified with gellan gum for preliminary screening for root-associating, free-living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizoplane of plants. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.66, p.2259-2263, 2002.
- LADHA, J.K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T.J.; SIX, J.; KESSEL, C.V. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. **Advances in Agronomy**, v.87, p.85-156, 2005.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.565-572, 2004a.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, v.166, p.525-530, 2004b.
- MERTENS, T.; HESS, D. Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of temperate region. **Plant and Soil**, v.82, p.87-99, 1984.
- MIRZA, M.S.; MEHNAZ, S.; ORMAND, P.; PRIGENT-COMBARET, C.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; BALLY, R.; MALIK,

- K.A. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.163-170, 2006.
- NOGUEIRA, M.C.S. **Estatística experimental aplicada à experimentação agrônômica**. Piracicaba: Esalq, 1997. 250p.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.
- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997. 285p. (IAC. Boletim, 100).
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.227-247, 2000.
- SALA, V.M.R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 123p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.345-352, 2005.
- SAUBIDET, M.I.; FATTA, N.; BARNEIX, A.J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v.245, p.215-222, 2002.
- TRIGO IAC-370 Armageddon. **O Agrônomo**, v.51, p.38, 1999.
- TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p.117-126, 2006.
- ZAMBRE, M.A.; KONDE, B.K.; SONAR, K.R. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. **Plant and Soil**, v.79, p.61-67, 1984.

Recebido em 17 de novembro de 2006 e aprovado em 3 de maio de 2007