

ESPECIFICIDADE NA INFECÇÃO DE RAÍZES POR AZOSPIRILLUM SPP EM PLANTAS COM VIA FOTOSSINTÉTICA C₃ E C₄¹

J.I. BALDANI², P.A.A. PEREIRA, R.E.M. da ROCHA³
e JOHANNA DÖBEREINER⁴

RESUMO - Resultados anteriores sobre a especificidade hospedeira na infecção de gramíneas com *Azospirillum* spp foram confirmados no presente trabalho, com maior número de espécies. No solo ocorreram as duas espécies de *Azospirillum* - *A. brasilense* e *A. lipoferum* - e, ainda estirpes denitrificantes (nir⁺) e não-denitrificantes (nir⁻). Os isolamentos de raízes esterilizadas de cereais de clima temperado com via fotossintética C₃ (trigo, cevada, aveia e centeio), foram predominantemente da espécie *A. brasilense*; e os de raízes esterilizadas de gramíneas tropicais com via C₄ foram predominantemente da espécie *A. lipoferum*. Em ambos os casos parece que as plantas, especialmente as C₃, apresentam seletividade para estirpes não denitrificantes. A única exceção nestas observações foi a cana-de-açúcar, que se comportou como os cereais temperados. Por outro lado, a tiritica, uma *Cyperaceae* com via C₄, foi infectada por *A. lipoferum*, como as gramíneas com via C₄.

Termos para indexação: especificidade hospedeira, *Azospirillum*, cereais C₃, gramíneas C₄, fixação de nitrogênio, *Rhizocoenosis*.

HOST PLANT SPECIFICITY IN THE INFECTION OF C₃ AND C₄ PLANTS BY AZOSPIRILLUM SPP

ABSTRACT - The occurrence of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* and their nir⁺ and nir⁻ variants was determined in soil and in non-sterilized and sterilized roots of the C₃ cereals wheat, rye, barley and oat and of several C₄ grasses. The C₃ cereals were planted in pots with red-yellow podzolic soil and examined at two growth stages. The C₄ forage grasses were collected in fields where the respective species were predominant. In all soils *A. brasilense* seemed to predominate. The proportion of *A. brasilense* nir⁻ was above 80% in all C₃ cereals when surface sterilized roots were examined. *Azospirillum* isolates from surface sterilized roots of C₄ grasses were predominantly *A. lipoferum* but only in some species (*Panicum maximum*, *Sorghum vulgare* and *Brachiaria* sp) the nir⁻ forms predominated. A weed belonging to Cyperaceae (*Cyperus rotundus*) was also infected by *A. lipoferum* nir⁻ as in the case of other C₄ grasses. The only exception among the C₄ Gramineae was sugar cane which seemed to behave like the C₃ cereals, and all 24 isolates from surface sterilized roots were *A. brasilense* nir⁻.

Index terms: host plant specificity, *Azospirillum*, C₃ cereals, C₄ grasses, nitrogen fixation, rhizocoenosis.

INTRODUÇÃO

As associações de gramíneas com bactérias fixadoras de N₂, recentemente denominadas rizocenosos (Baldani & Döbereiner 1979), estão sendo estudadas sob diferentes ângulos. Fatores ligados à interação planta-bactéria receberam enfoque especial. Entretanto, aspectos como especificidade na infecção das raízes por essas bactérias têm sido pouco explorados. Uma das poucas evidências de

especificidade hospedeira em gramíneas foi demonstrada na rizocenose de um ecótipo de *Paspalum notatum* com *Azotobacter paspali* (Döbereiner 1966). Essa associação parece mais restrita ainda que a simbiose das leguminosas, já que se limita a apenas alguns ecótipos de uma espécie (Döbereiner 1970).

Por outro lado, *Azospirillum* spp são consideradas como as principais bactérias fixadoras de N₂ em gramíneas forrageiras e de grãos, em clima tropical (Day & Döbereiner 1975; Bülow & Döbereiner 1975), assim como em algumas regiões de clima temperado (Vlassak & Reynders 1979; Pedersen et al. 1978). Com as primeiras observações de infecção de raízes por *Azospirillum* spp em *Digitaria* (Döbereiner & Day 1976), milho (Bülow & Döbereiner 1975), trigo (Nery et al. 1977), e com

¹ Aceito para publicação em 15 de agosto de 1980.

² Eng^o Agr^o, M.Sc., SNLCS - EMBRAPA, km 47, CEP 23.460 - Seropédica, RJ.

³ Alunos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e bolsistas do CNPq.

⁴ Eng^o Agr^o, D.Sci., SNLCS - EMBRAPA, km 47, CEP 23.460 - Seropédica, RJ.

posterior confirmação de infecção da córtex e do cilindro central em raízes de milho (Patriquin & Döbereiner 1978), grande enfoque tem-se dado a essa estreita interação planta-bactéria.

Motivados por esses aspectos, estudos recentes (Baldani & Döbereiner 1979) mostraram especificidade hospedeira em milho, trigo e arroz na infecção das raízes por *Azospirillum* spp. Enquanto trigo e arroz se mostraram mais favoráveis à infecção por *A. brasilense* nir⁻, as raízes de milho parecem ser preferencialmente infectadas por *A. lipoferum*. Com o objetivo de ampliar os resultados de Baldani & Döbereiner (1979), foi comparada a especificidade de infecção por *Azospirillum* spp entre um grupo de gramíneas com via fotossintética C₃, de clima temperado, e outro com via C₄, de clima tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido em casa de vegetação um experimento de vasos com os cereais temperados com via fotossintética C₃: aveia (*Avena sativa*), centeio (*Secale cereale*), cevada (*Hordeum vulgare*) e trigo (*Triticum aestivum*). O experimento, composto de oito tratamentos, com quatro cereais, duas épocas de coletas e sete repetições, no total de 56 vasos, foi disposto em blocos completamente casualizados. Solo Podzólico Vermelho-Amerelo série Itaguaí bem homogeneizado, foi uniformemente distribuído nos vasos. Adubação básica, constituída de 20 ppm N (CaNO₃) e de 60 ppm P (K₂HPO₄), e elementos menores + Mg (Baldani & Döbereiner 1979) foram aplicados em forma de solução. As sementes dos cereais (variedades comerciais) foram esterilizadas com HgCl₂ (1:500) durante 30 segundos, seguindo-se sucessivas lavagens com água, antes do plantio nos vasos.

Em condições de campo foi estudada a especificidade de infecção em um grupo de plantas com via fotossintética C₄, composto de oito gramíneas (*Brachiaria* sp, *Panicum maximum*, *Cynodon dactylon*, *Pennisetum purpureum*, *Hemarthria altissima*, *Digitaria decumbens*, *Sorghum vulgare* e *Saccharum* spp.) e de uma Cyperaceae (*Cyperus rotundus*). Amostras de raízes e de solos próximos das mesmas foram coletadas em cinco locais diferentes, onde cada uma das gramíneas utilizadas mostrava-se predominante. Os solos variaram conforme o local. Foram identificados como Planossolo série Agrostologia e série Ecologia, e como solo Podzólico Vermelho-Amarelo da série Itaguaí.

Azospirillum spp foram isolados de solos e raízes, com ou sem esterilização, em cloramina T (1%), pelo método descrito por Baldani & Döbereiner (1979). A identificação das espécies foi feita de acordo com Tarrand et al. (1978); e a dos grupos de denitrificação, de acordo com Neyra

et al. (1977). O tempo máximo de esterilização dependia da resistência das raízes das diferentes espécies para as quais foi determinado em ensaios preliminares.

RESULTADOS

O objetivo básico do primeiro experimento foi verificar a infecção das raízes de cereais de clima temperado por estirpes de *Azospirillum* spp nativas do solo, já que os mesmos não são cultivados na área e não foram inoculados com *Azospirillum* spp.

Observamos, na Tabela 1, que mais de 95% dos isolamentos do solo foram identificados como *A. brasilense*, sendo semelhante a percentagem de formas nir⁺ e nir⁻ (nitrito redutase positivos e negativos). *A. lipoferum* apresentou-se em baixa percentagem apesar de os referidos cereais terem sido plantados nestes solo pela primeira vez.

Houve infecção abundante das raízes. Na maioria das vezes, cada pedaço de raiz produziu culturas positivas. A composição da população de *Azospirillum* spp, observada nas raízes dos cereais de clima temperado, foi como a do trigo plantado no campo (Baldani & Döbereiner 1979): 70 a 80% das estirpes isoladas foram *A. brasilense* nir⁻. As estirpes isoladas restantes foram *A. lipoferum* nir⁻. Não houve, quase, ocorrência de estirpes denitrificantes. O aparecimento de *A. lipoferum*, que não ocorreu em números apreciáveis no solo e que parece mais acentuado em raízes não esterilizadas, indica um possível papel desta espécie também em cereais C₃, mas não no interior das raízes. Observações semelhantes foram feitas com trigo e arroz (também plantas C₃) (Baldani & Döbereiner 1979). Comparando-se o efeito do tempo de esterilização de raízes na percentagem de isolados identificados como *A. brasilense* nir⁻, verificamos que a esterilização mais prolongada (cinco minutos) favoreceu o isolamento de *A. brasilense* nir⁻. Patriquin & Döbereiner (1978) observaram que, após tempos crescentes de esterilização de raízes com cloramina T, efetuada de acordo com a estrutura das raízes, há eliminação progressiva da microflora até a parte inferior da córtex e o cilindro central. Isto vem reforçar ainda mais os resultados encontrados por Baldani & Döbereiner (1979), onde, com esterilização de raízes de

trigo e arroz por quinze minutos, mais de 90% dos isolados foram identificados como *A. brasilense nir⁻*.

No estudo de especificidade de infecção de raízes de gramíneas de via fotossintética C₄ por *Azospirillum* spp, realizado em plantas coletadas no local onde as mesmas predominam, podemos observar a predominância de *A. brasilense* nos solos da região. (Tabela 2). Dos isolamentos obtidos, 60% foram identificados como *A. brasilense nir⁻*; os 40% restantes foram distribuídos entre *A. lipoferum nir⁻* — maior percentagem —, e *A. brasilense nir⁺*. As amostras de solo utilizadas neste traba-

lho foram retiradas das proximidades das plantas, mas não da rizosfera. Amostras de solo da rizosfera de milho crescido no campo mostraram ocorrência predominante (84%) de *A. lipoferum* (Baldani & Döbereiner 1979).

Apesar da incidência predominante de *A. brasilense nir⁻* no solo, os isolamentos obtidos de raízes foram predominantemente *A. lipoferum*. A discriminação em favor de *A. lipoferum* foi mais acentuada ainda em raízes esterilizadas. Das nove espécies com fotossíntese C₄ estudadas, oito (incluindo a *Cyperacea*) apresentaram mais de 80% de *A. lipoferum*, com pouca variação em

TABELA 1. Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp em gramínea C₃ de clima temperado^a.

Espécies (amostra)	Esterilização em cloramina T (minutos)	Nº de isolados	% de isolados			
			<i>A. lipoferum</i>		<i>A. brasilense</i>	
			nir ⁺	nir ⁻	nir ⁺	nir ⁻
Solo	0	11	0	0	0	100
Aveia						
Solo ^c	0	19	0	0	42	58
Raízes	0	9	0	0	0	100
Raízes	0,5	14	0	28	0	72
Raízes	5,0	5	0	20	0	80
Centeio						
Solo ^c	0	8	0	13	12	75
Raízes	0	6	0	67	0	33
Raízes	0,5	22	0	18	0	82
Raízes	5,0	—	—	—	—	—
Cevada						
Solo ^c	0	10	0	0	50	50
Raízes	0	16	0	18	0	82
Raízes	0,5	19	0	26	5	69
Raízes	5,0	11	0	18	0	82
Trigo						
Solo ^c	0	10	10	0	30	60
Raízes	0	4	0	50	0	50
Raízes	0,5	15	20	0	0	80
Raízes	5,0	4	0	25	0	75

^a Sementes esterilizadas de variedades comerciais foram plantadas em sete vasos. Para cada espécie foram tiradas duas amostras, cada uma em épocas diferentes (28 amostras de cada cereal). Nem todos os isolamentos obtiveram sucesso; o número de estirpes realmente isoladas está contido na Tabela.

^b Amostras de solo retiradas do campo onde foi colhido o solo para preenchimento dos vasos.

^c Solo dos vasos.

TABELA 2. Especificidade na infecção de gramíneas com fotossíntese C₄ por *Azospirillum* spp.^a

Espécie	Amostra	Tempo de esterilização cloramina T (minutos)	Nº de isolados	% de isolados			
				<i>A. lipoferum</i>		<i>A. brasilense</i>	
			nir ⁺	nir ⁻	nir ⁺	nir ⁻	
<i>Brachiaria</i> sp.	Solo	0	5	0	0	0	100
	Raízes	0	19	53	21	0	26
	Raízes	1	12	17	83	0	0
<i>Panicum maximum</i>	Solo	0	10	0	0	10	90
	Raízes	0	12	42	25	8	25
	Raízes	0,5	5	0	100	0	0
	Raízes	30	6	16	84	0	0
<i>Cynodon dactylon</i>	Solo	0	4	0	100	0	0
	Raízes	0	9	33	45	22	0
	Raízes	0,5	7	86	14	0	0
<i>Pennisetum purpureum</i>	Solo	0	6	0	0	16	84
	Raízes	0	14	71	14	7	8
	Raízes	0,5	3	67	33	0	0
<i>Hemarthria altissima</i>	Solo	0	5	0	8	20	0
	Raízes	0	16	19	62	0	19
<i>Digitaria decumbens</i>	Solo	0	6	0	100	0	0
	Raízes	0	2	100	0	0	0
<i>Sorghum vulgare</i>	Solo	0	5	0	0	0	100
	Raízes	0	8	25	0	0	75
	Raízes	15	14	64	36	0	0
	Raízes	30	5	20	80	0	0
<i>Saccharum</i> spp	Solo	0	5	0	0	20	80
	Raízes	0	4	0	75	0	25
	Raízes	1	24	0	0	0	100
<i>Cyperus rotundus</i>	Solo	0	5	0	0	0	100
	Raízes	0,25	5	0	100	0	0

^a Amostras foram coletadas no campo em cinco sítios diferentes, sempre onde a espécie era predominante.

relação à característica de ser nir⁺ e nir⁻. Entretanto, com esterilização mais prolongada (30 minutos), raízes de *Panicum* e sorgo apresentaram 85% dos isolados como *A. lipoferum* nir⁻. A especificidade na infecção de raízes de plantas C₄ por *A. lipoferum*, encontrada neste trabalho, confirma e estende os resultados de Baldani & Döbereiner (1979), onde raízes de milho esterilizadas, tanto do campo como de experimento de vasos, semelhante ao descrito aqui, renderam quase que exclusivamente *A. lipoferum*. Um exame mais deta-

lhado dos dados de Baldani & Döbereiner (1979) revelou ainda que, em raízes de milho esterilizadas por tempo mais prolongado (1 h) também houve predominância de formas não denitrificantes (nir⁻) (Döbereiner & De-Polli 1979).

A cana-de-açúcar apresentou-se como exceção em relação à infecção por *Azospirillum*, uma vez que a espécie encontrada com maior frequência foi *A. brasilense* nir⁻. Contudo, há necessidade de um estudo mais detalhado desta planta, visto que a mesma não é predominante na região.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados confirmam e ampliam os dados apresentados por Baldani & Döbereiner (1979) e evidenciam diferenças básicas entre plantas temperadas com via fotossintética C₃ e plantas com via C₄, em relação à infecção por *Azospirillum* spp. A cana-de-açúcar, embora seja uma típica planta C₄, exige estudos mais apurados em face da exceção observada. Outros microorganismos fixadores de N₂ foram isolados de raízes de cana (Döbereiner 1961; Döbereiner et al. 1972, Ruschel 1979) e, principalmente, *Beijerinckia* spp., mostraram estreita interação com esta planta. Fixação de N₂ no solo da rizosfera da cana (Döbereiner et al. 1972, Ruschel et al. 1978), que não foi observada em outras gramíneas, mostra diferença adicional deste sistema solo-planta.

A infecção seletiva por *A. brasilense* nir⁻ de vários cereais temperados, que nunca tinham sido plantados nesta região, levanta a questão da origem de bactérias específicas para tais espécies. Na verdade, o arroz, outra planta C₃, é comumente plantado na região, mas não há histórico do plantio desta planta no local onde o solo para o experimento de vasos foi colhido. Em estudos de reações cruzadas com anticorpos imuno fluorescentes, as estirpes de *A. brasilense* nir⁻ isoladas de arroz e trigo se mostraram idênticas, e distintas das demais (De-Polli et al. 1979, De-Polli et al. 1980). Estas observações indicam que há uma diferença pronunciada na infecção de plantas C₃ em relação às plantas com via C₄, mas entre as plantas C₃, pelo menos, não há especificidade para a espécie. Em outras palavras, os cereais de clima temperado e o arroz parecem ser infectados pelo mesmo tipo de *Azospirillum*. Os dados apresentados no presente trabalho não permitem conclusão neste sentido para as plantas com via C₄, já que parece haver diferenças entre plantas em relação à preferência de estirpes nir⁻ e nir⁺ (Tabela 2) e ainda há falta de um grupo homogêneo nos testes com anticorpos imunofluorescentes (Döbereiner & De-Polli 1979).

A ocorrência da especificidade hospedeira na infecção da gramínea por *Azospirillum* spp. indica estreitas interrelações bactéria-planta. Possivelmente, a preferência por uma ou outra espécie

está ligada a características fisiológicas da planta. A infecção preferencial de plantas com via fotossintética C₄ por *A. lipoferum* pode ser ligada à disponibilidade de açúcares no sítio onde a bactéria ocorre, isto é, no cilindro central e na córtex interior (Döbereiner & De-Polli 1979), já que esta espécie, ao contrário de *A. brasilense*, utiliza glicose. A localização da bactéria, que no milho e em algumas outras plantas C₄ é predominantemente no cilindro central, quando a atividade da nitrogenase é elevada (Magalhães et al. 1979), parece relacionada com a especificidade na infecção. Pouco se sabe até hoje sobre a localização de *Azospirillum* nas raízes de plantas C₃. Observações preliminares com arroz (Baldani & Döbereiner, prelo) indicam eliminação da atividade da nitrogenase por esterilização superficial das raízes.

É interessante esta observação: as formas de *Azospirillum* não denitrificantes parecem predominar no processo de infecção das raízes especialmente nos cereais temperados. Isto indica diferenças, além das características fisiológicas, no uso ou não da glicose, que determinam a especificidade. Testes com anticorpos imuno fluorescentes, preparados com quatro destas estirpes, confirmam diferenças dentro das duas espécies relacionadas com a característica de denitrificação (De-Polli et al. 1980, Döbereiner & De-Polli 1979). A seleção, tanto por plantas C₃ como C₄ de formas de *Azospirillum* não denitrificantes (nir⁻), indica vantagens, no processo evolucionário, que favorecem a planta, reforçando, assim, a característica simbiótica com vantagens mútuas, tanto da planta como da bactéria nas rizocenoses com *Azospirillum* spp. Em vista das possibilidades de perdas de nitratos do solo e dos fertilizantes, é muito importante o conhecimento e possível alteração da ocorrência, no solo, de formas denitrificantes de *Azospirillum* spp.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 12:433-39, 1980.
BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of maize wheat and rice with *Azospirillum* spp. INTERNATIONAL WORKSHOP ON ASSOCIATIVE N₂-FIXATION, Piracicaba, 1979.

- BULOW, J.F.W. von & DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 72:2389-93, 1975.
- DAY, J.M. & DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N₂-Fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. Soil Biol. Biochem., 8:45-50, 1975.
- DE-POLLI, H.; BOHLOOL, B.B. & DÖBEREINER, J. Immunofluorescence differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host plant specificity groups. INTERNATIONAL WORKSHOP ON ASSOCIATIVE N₂-FIXATION, Piracicaba, 1979.
- DE-POLLI, H.; BOHLOOL, B.B. & DÖBEREINER, J. Serological differentiation of *Azospirillum* species belonging to different host plant specificity groups. Arch. Microbiol., 126:217-22, 1980.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp.n, uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. Pesq. agropec. bras., 1:357-65, 1966.
- DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum* Flugge. Zentralbl. Bakt. Parasitenk II., 124:224-30, 1970.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. Plant Soil, 14:211-7, 1961.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J. International Symposium N₂ fixation. Washington State Univ. Press, 1976. p.518-38.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. & DART, P.J. Nitrogenase activity of sugar cane and some other tropical grasses. Plant Soil, 37:191-6, 1972.
- DÖBEREINER, J. & DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM NITROGEN FIXATION. Phytochemical Society of Europe, Univ. of Sussex, 1979.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D. & DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. Rev. Brasil. Biol., 39:587-96, 1979.
- NERY, M.; ABRANTES, G.T.V.; SANTOS, D. dos & DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em trigo. Rev. Bras. Ci. Solo, 1:15-20, 1977.
- NEYRA, C.A.; DÖBEREINER, J.; LALANDE, R. & KNOWLES, R. Denitrification by N₂-fixing *Spirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol., 23:300-5, 1977.
- PATRIQUIN, D.G. & DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Can. J. Microbiol., 24:734-42, 1978.
- PEDERSEN, W.L.; CHAKRABARTY, K.; KLUCAS, R. V. & VIDAVER, A.K. Nitrogen fixation (Acetylene reduction) associative with roots of winter wheat and sorghum on Nebraska. Appl. Environ. Microbiol., 35:129-35, 1978.
- RUSCHEL, A.P. Associative N₂-Fixation by sugarcane. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ASSOCIATIVE N₂-FIXATION, Piracicaba, 1979.
- RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E. & HENIS, Y. Nitrogen fixation in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Ecol. Bull. Stockholm, 26:297-303, 1978.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. & DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol., 24:967-80, 1978.
- VLAŠSAK, K. & REYNDERS, L. Agronomic aspects of biological dinitrogen fixation by *Azospirillum* spp. in temperate region. INTERNATIONAL WORKSHOP ON ASSOCIATIVE N₂-FIXATION, Piracicaba, 1979.