

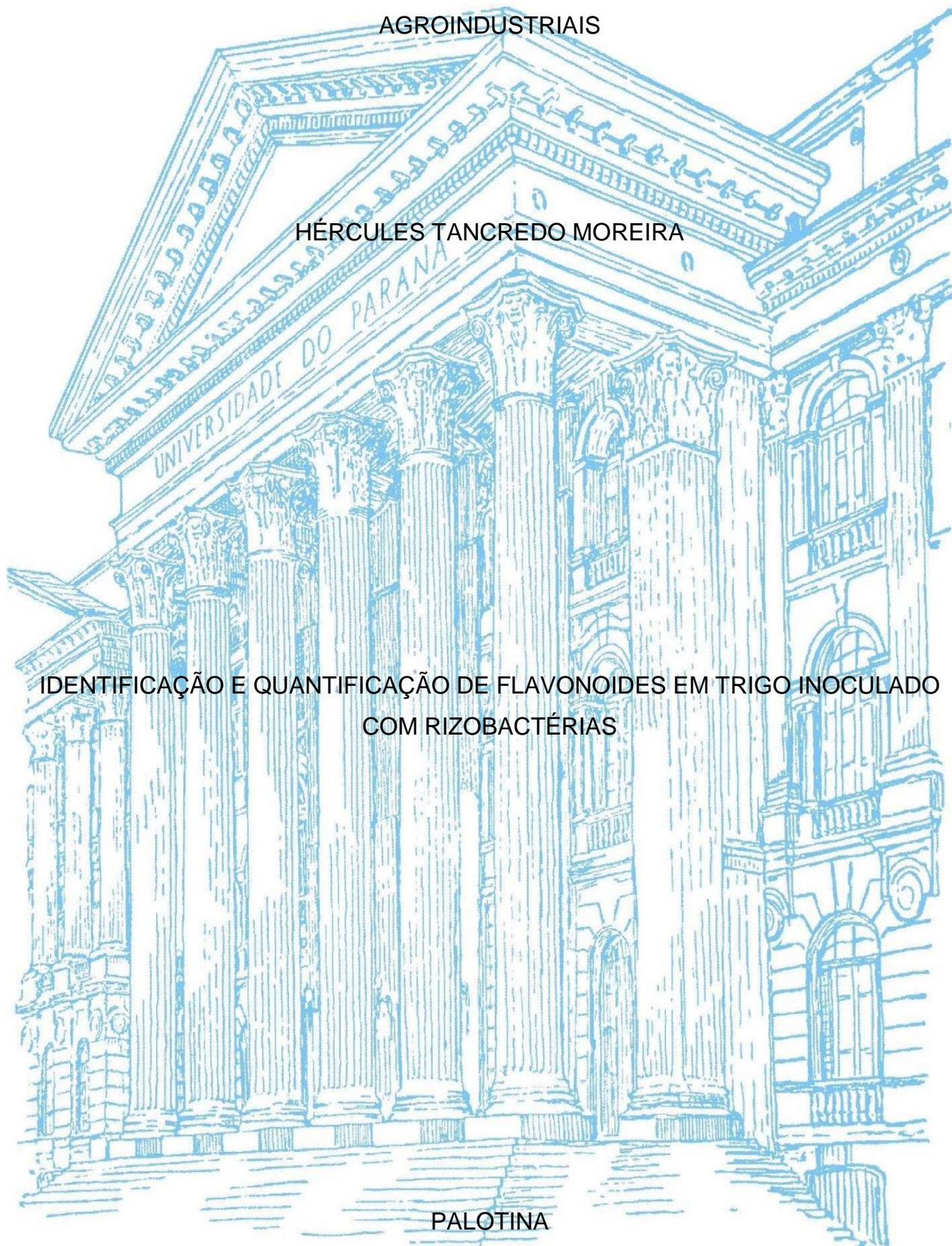
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE PALOTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE BIOPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS

HÉRCULES TANCREDO MOREIRA

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES EM TRIGO INOCULADO
COM RIZOBACTÉRIAS

PALOTINA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE PALOTINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA DE BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

HÉRCULES TANCREDO MOREIRA

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES EM TRIGO INOCULADO
COM RIZOBACTÉRIAS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais, no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais, Setor Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Robson Fernando Missio
Coorientadora: Prof^a. Dr.^a Luciana Grange

PALOTINA

2017

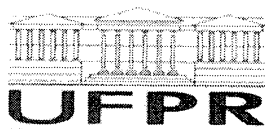
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M672 Moreira, Hércules Tancredo
 Identificação e quantificação de flavonoides
 em trigo inoculado com Rizobactérias / Hércules Tancredo
 Moreira.-- Palotina, 2017
 59f.

Orientador: Robson Fernando Missio.
Coorientadora: Luciana Grange.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais.

1. Flavonoides. 2. Fixação biológica. 3. Trigo.
I. Missio, Robson Fernando. II. Grange, Luciana. III.
Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 631



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação TECNOLOGIAS DE BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TECNOLOGIAS DE BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **HERCULES TANCREDO MOREIRA** intitulada: **Identificação e quantificação de flavonoides em trigo inoculado com rizobactérias**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

aprovação.

PALOTINA, 12 de Maio de 2017.


ROBSON FERNANDO MISSIO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LUCIANA GRANGE

Co-orientador - Avaliador Externo (UFPR)



À minha família por sempre estar
presente, incentivando e guiando pelo
caminho correto, mesmo com todas as
dificuldades encontradas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná pela oportunidade do ingresso no curso.

Ao meu orientador Robson Fernando Missio e minha coorientadora Luciana Grange pela confiança, orientação e grande ajuda no desenrolar desses dois anos para a finalização do mestrado.

Aos professores responsáveis pelo laboratório de química em especial ao professor Dr. Isac George Rosset que com sua enorme paciência, prestatividade, ensinamentos e principalmente pela concessão do laboratório me auxiliou nos experimentos,

Aos técnicos da UFPR em especial aos técnicos Guilherme Lenz e Joelmir dos Santos e a todos os outros que me auxiliaram com materiais, procedimentos ou que de alguma maneira colaboraram para a realização de qualquer etapa dos experimentos com toda a prestatividade possível.

Aos amigos do curso de agronomia Lucas M. Hass, Anderson J. Scherer, Jhonatan R. H. Hister e aos amigos Jussara Lunkes, Kelly Garcia e Bruno Ricardo Villanova Alves que me ajudaram e participaram dos experimentos desde a casa de vegetação até a etapa de tratamentos dos dados, e a todos os demais colegas que me ajudaram em qualquer etapa presente durante todo o curso.

A todos os meus amigos que me ajudaram pelo simples fato de entenderem a minha ausência em determinados períodos e me proporcionaram momentos de descontração, amizade e alegria.

Aos meus pais Diana Cavazzini e Osmar Moreira, por serem meus guias na vida, por sempre me incentivar, acreditar no meu potencial e me formarem da melhor maneira possível.

A Marlene Raatz pelos cuidados, dedicação e conselhos sempre me ajudando.

Aos meus avós Agenor e Juracy Cavazzini que incentivaram sempre os estudos mesmo sem o possuir, e sabiam que apenas ele pode gerar mudanças.

A minha amada esposa Monica, que não importando a circunstância sempre está ao meu lado, incentivando, sorrindo e me amando.

E finalmente, mas principalmente a Deus que é o Norte de qualquer etapa de minha vida.

Tanto o que acredita ser capaz de
fazer alguma coisa quanto aquele que
não acredita, ambos estão certos.

Henry Ford

RESUMO

O trigo é uma das culturas mais importantes para a humanidade. No Brasil, o estado do Paraná é o maior produtor anual do grão, porém pesquisas mais detalhadas em relação a fixação de nitrogênio, mais especificamente a comunicação das gramíneas com bactérias são escassas. Os flavonoides são descritos como as substâncias que conseguem intermediar essa comunicação. O presente trabalho teve por objetivos avaliar a presença e a quantificação de flavonoides na raiz do trigo (*Triticum aestivum*) cultivar CD150. Os tratamentos foram as bactérias *Azospirillum brasiliense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasiliense* em conjunto com *Herbaspirillum seropedicae*, *Enterobacter sp.* - estirpes nº 203; nº 208 e nº 493; tratamento controle com e sem adição de nitrogênio em substrato inócuo de areia. Após 42 dias foram avaliados o comprimento radicular e da parte aérea, assim como a massa seca de raízes e parte aérea. Amostras das raízes foram tratadas e avaliadas pelo HPLC e espectrofotômetro UV para quantificação dos flavonoides totais em mg. Os resultados foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade. O comprimento das raízes apresentaram diferença significativa entre os tratamentos realizados, foi observado incremento da massa seca da raiz, devido a presença do nutriente e do aumento da taxa fotossintética. O comprimento da parte aérea também apresentou diferença estatística, e o tratamento testemunha sem nitrogênio apresentou a menor massa seca da parte aérea (37,5 mg). Houve efeito significativo no teor total de flavonoides entre os tratamentos realizados.

Palavras-chave: Flavonoides, trigo, raiz, fixação biológica.

ABSTRACT

Wheat is one of the most important crops for mankind. In Brazil, the state of Paraná is the largest annual producer of the grain, but more detailed research regarding nitrogen fixation, more specifically communication of grasses with bacteria is scarce. Flavonoids are as if they were the media. The present work had as objectives to evaluate a presence and quantification of flavonoids in the wheat root (*Triticum aestivum*) cultivar CD150. The treatments were as bacteria *Azospirillum brasiliense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasiliense* together with *Herbaspirillum seropedicae*, *Enterobacter* sp. strains no. 203; Nos. 208 and 493; Control treatment and without addition of nitrogen in innocuous sand substrate. After 42 days they were oriented either with root and shoot, as well as a dry mass of roots and shoot. Samples as roots were treated and evaluated for HPLC and UV spectrophotometer for quantification of total flavonoids in mg. The results were submitted to analysis of variance, and as averages compared by t test at 5% of probability. The length of the raises showed the significant difference between the treatments, it was observed from the dry mass of the root, due to the nutrition and the increase of the photosynthetic rate. In addition, the control treatment without nitrogen had the lowest dry mass of the shoot (37.5 mg). There was a significant effect on total flavonoid content among treatments.

Key words: Flavonoids, wheat, root, biological fixation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	25
Figura 2 - ROTA BIOQUIMICA DOS FLAVONOIDES.	27
Figura 3 - PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES.....	28
Figura 4 - CROMATOGRAMA QUERCITINA.....	34
Figura 5 - CROMATOGRAMA RUTINA	34
Figura 6 - CROMATOGRAMA CUMARINA.....	35
Figura 7 - CROMATOGRAMA ISOFLAVONA.....	35
Figura 8 - CROMATOGRAMA.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - LEVANTAMENTO DE FLAVONOIDES.....	24
Tabela 2 - SUBCLASSES E CARACTERÍSTICAS DOS FLAVONOIDES	28
Tabela 3 - SOLUÇÃO NUTRITIVA UTILIZADA NO EXPERIMENTO COM AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO (0 mg L ⁻¹)	31
Tabela 4 - SOLUÇÃO NUTRITIVA UTILIZADA NO EXPERIMENTO COM 50 mg L ⁻¹ DE NITROGÊNIO.....	31
Tabela 5 - VALORES DE FLAVONOIDES TOTAIS, PORCENTAGEM DE QUERCITINA E RUTINA EM RELAÇÃO AO TOTAL (CD150)	38
Tabela 6 - VALORES MÉDIOS DAS VARIÁVEIS AGRONÔMICAS ESTUDADAS ..	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAB	- Companhia Nacional de abastecimento
SEAB	- Secretaria da Agricultura e Abastecimento
A.C.	- Antes de Cristo
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
COODETEC	- Cooperativa Central de Desenvolvimento Tecnológico
FBN	- Fixação Biológica de Nitrogenio
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
UV	- Ultravioleta
PAL	- FenilalanineAmonoliase.
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
DYGS	- Dextrose Yeast Glucose Sucrose
YM	- Yeat Malt Extract
mg.	- Miligrama
g.	- Grama
cm.	- Centimetro
µg.	- Micrograma
dm.	- Decimetro
sp.	- Espécies
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
HPLC	- High performance liquid chromatography
CLAE	- Cromatografia Líquida de alta eficiência.
ACN	- Acetonitrila.
L	- Litro
N	- Nitrogênio
P	- Fósforo
K	- Potássio
Ca	- Cálcio
Mg	- Magnésio
S	- Enxofre
Cl	- Cloro
Prof.	- Professor

Dra.	- Doutora
Dr.	- Doutor
Resp.	- Responsável
PSI	- Libra-Força Por Polegada Quadrada
N-	- Tratamento sem nitrogênio
N+	- Tratamento com nitrogênio
ha	- Hectares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	JUSTIFICATIVA.....	14
1.2	OBJETIVOS	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	ESPÉCIE VEGETAL.....	16
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)	18
2.3	FLAVONOIDES	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	ESPÉCIE VEGETAL.....	29
3.2	PREPARO DAS SEMENTES	29
3.3	MICROORGANISMOS.....	29
3.4	PREPARO DOS TRATAMENTOS	30
3.5	EXTRAÇÃO.....	32
3.6	ESPECTROFOTOMETRIA	32
3.6.1	Preparo das amostras espectrofotômetro	32
3.7	HPLC.....	33
3.7.1	Curva analítica HPLC	33
3.7.2	Preparo das amostras HPLC	36
3.8	TESTES ESTATÍSTICOS.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
4.1	FLAVONOIDES	38
4.2	VARIÁVEIS AGRONÔMICAS	43
5	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Triticum aestivum vulgarmente conhecido como trigo é a segunda cultura de grãos mais produzida no mundo, e se apresenta como constituinte fundamental da alimentação humana (JOSHI et al., 2007; JONES, 2005). A produção brasileira de trigo em 2016 foi de aproximadamente 6,7 milhões de toneladas (CONAB, 2016), sendo o estado do Paraná o responsável por mais da metade da produção nacional (SEAB, 2017).

Vários entraves tornam difícil a produção e a difusão do plantio de trigo pelo território brasileiro, como fatores técnicos e biológicos do cultivar, difícil controle de doenças (OLIVEIRA, 2016), as facilidades encontradas no cultivo de outras espécies como milho e soja, tornando-as preferenciais, falta ou dificuldade de crédito, preços atrativos e o escoamento da produção (BRUM e MULLER, 2008).

Como um empecilho encontrado para sua difusão pode-se citar a dificuldade da absorção de nitrogênio que as gramíneas como o trigo enfrentam (HUNGRIA et al., 2007), sendo necessária a utilização de fertilizantes ricos em nutriente nas lavouras encarecendo a produção. Diante disso, algumas técnicas e estudos estão sendo realizados a fim de facilitar a absorção de nitrogênio pela planta, como por exemplo, o aprimoramento genético ou a melhoria da quimiotaxia entre planta e microorganismos fixadores de nitrogênio como bactérias diazotróficas (DOBBELAERE e CROONENBORGHS, 2002).

Grande parte do nitrogênio proveniente da adubação é perdido principalmente por lixiviação e volatilização que acontecem naturalmente (BHATTCHAJEE 2008), mesmo perdendo grande parte do nitrogênio proveniente da adubação, algumas bactérias fixadoras conseguem através de nitrificação ou amonificação introduzir quantidades necessárias do nutriente ao metabolismo da

planta (CHAMAM et al., 2013), isso acontece devido a quimiotaxia que se resume basicamente como a comunicação entre as plantas e bactérias que naturalmente se encontram na rizosfera (MALAVOLTA 2006), essa comunicação ocorre devido a exsudatos liberados pela raiz, que atraem os microrganismos da rizosfera facilitando o encontro de planta com bactéria. Dentre esses exsudatos podemos reconhecidamente descrever os flavonoides (KOBAYASHI et al., 2004), compostos fenólicos identificados como metabólitos secundários hidrossolúveis, presentes em quase todos os órgãos das plantas em concentrações distintas, apresentando funções diferenciadas dentro do metabolismo (CHAMAM et al., 2013).

O trigo, os flavonoides e as bactérias (*Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Enterobium*) utilizadas como tratamentos no presente trabalho, já foram estudadas (BASHAN et al. 2005), porém as análises da quantificação dos flavonoides presentes em raiz de trigo inoculado com diferentes microrganismos ainda não foram avaliadas.

Portanto o trabalho teve por objetivo a quantificação e identificação de flavonoides em raízes de trigo, de acordo com os diferentes tipos de inoculações com rizobactérias.

1.1 JUSTIFICATIVA

Com o inevitável crescimento populacional, o incremento da produção agrícola precisa ser ampliado anualmente.

Como o aumento da área de produção é um fator limitante na agricultura faz-se necessário a melhoria dos aspectos produtivos e o aumento da produção através

de fatores como a melhoria da nutrição, melhoramento genético das cultivares, ganho de absorção de nitrogênio através de técnicas como a fixação biológica para que uma melhora efetiva da produção realmente aconteça.

Um dos fatores que melhora a comunicação da planta com as bactérias fixadoras de nitrogênio é o exsudato que a própria planta libera no solo em consonância com outras moléculas. Temos presentes nesses exsudatos os flavonoides, foco desse trabalho, como facilitador da quimiotaxia entre planta e bactéria. Essa atividade é uma grande ajuda para o produtor conseguir efetivamente uma melhora na produção e principalmente diminuição dos custos, já que o nitrogênio é uma fonte de nutriente cara, além de seu excesso ser prejudicial para o ambiente, causando problemas como eutrofização de rios e lagos além de ser relacionado como agente facilitador de extinção de espécies.

Portanto, faz-se necessário esse trabalho para a quantificação e identificação de flavonoides em raiz de trigo, visando um melhor entendimento quanto a sua função no aspecto de quimiotaxia com os microorganismos fixadores de nitrogênio em gramíneas.

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal a identificação e a quantificação de flavonoides totais em raízes de trigo (*Triticum aestivum*) cultivar CD150, submetidos a diferentes tratamentos com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Avaliar aspectos agronômicos, como o comprimento e a massa seca da raiz e parte aérea do trigo, analisando as diferenças causadas pelos tratamentos aplicados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESPÉCIE VEGETAL

O trigo está entre as espécies vegetais mais consumidas pela humanidade (JOSHI et al. 2007), pelas suas características nutricionais se tornou matéria prima de vários ramos industriais, citando o alimentício como sua principal função, já que mais de um terço da população mundial o utiliza como alimento básico (SLEPER e POEHLMAN, 2006).

O trigo pertence à família Gramineae, tribo Triticeae, subtribo Triticinae a espécie mais cultivada é a *Triticum aestivum*. De comportamento autógamo, possuindo inúmeras cultivares disponíveis em todo mundo.

Sua domesticação ocorreu nas lavouras primitivas do Sudeste da Ásia de 7000 a 9000 anos A.C., sendo introduzido na Índia, China e Europa desde 5000 anos A.C. (BRAMMER, 2000; MORAES et al., 2000).

No Brasil cultivam-se trigos de inverno e de primavera, sendo o de hábito primaveril cultivado preferencialmente por não necessitar de frio próximo a zero para completar seu ciclo reprodutivo (EMBRAPA, 2005).

Em 2016 o Brasil colheu 6,7 milhões de toneladas de trigo em seu território (IBGE, 2016). Em comparação com a safra de 2015 que foi de 5,5 milhões de toneladas houve um crescimento acima de 15% (CONAB, 2016).

O trigo tem grande destaque na economia da região Oeste do Paraná, pois a cadeia produtiva abrange setores como a pesquisa, produção, industrialização e a comercialização, gerando emprego e renda.

Sozinho, o estado do Paraná obteve produção de 3.383.850 toneladas plantadas em 1.084.294 hectares. Desse montante, estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de toneladas são utilizadas pelos moinhos locais, 750

mil toneladas vendidas para outros estados, 150 mil toneladas utilizadas como sementes, 120 mil toneladas utilizadas na indústria de ração animal restando 313 mil toneladas de estoque. Vale lembrar que mesmo com produção recorde, o estado ainda necessita acrescentar 450 mil toneladas de trigo vindas do Paraguai a fim de suprir a necessidade do grão e ainda manter nível de estoque razoável (SEAB, 2017).

A produção de trigo no Brasil sofre com alguns entraves que influenciam a escolha pela soja e milho como cultivo pelo agricultor. Destacam-se os fatores técnicos, os políticos e econômicos. Como fatores técnicos destaca-se, por exemplo, que o trigo deixa pouca matéria orgânica no sistema, poucas cultivares adaptadas a regiões quentes, baixa eficiência no controle de doenças como ferrugem e bruzone (OLIVEIRA, 2016).

Os fatores políticos dificultam o cultivo do trigo, já que a falta de políticas de garantia de preço, pouco incentivo ao trigo nacional, preço pouco atrativo frente ao milho safrinha e grande estímulo a cultura do milho são entraves cotidianos. Existem também os fatores econômicos, entre eles estão o alto custo com menor rentabilidade frente ao milho, excessivas exigências dos bancos para liberação de crédito pelo risco da cultura (OLIVEIRA, 2016).

Até mesmo empecilhos operacionais acarretam a depreciação do trigo, como a facilidade do manejo do milho frente ao trigo devido a maquinários mais eficientes, tardia época de plantio no Sul do país o que atrapalha a safra de verão, dificuldade na absorção de nitrogênio pela planta, exigência de qualidade sem preço equivalente e a dificuldade de escoamento da produção (BRUM e MULLER, 2008).

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

O aumento da população torna necessário o incremento da produção agrícola através do aumento da área de produção, aprimoramento de técnicas e do melhoramento das cultivares (HUNGRIA et al., 2007).

Possibilidades para viabilizar uma produção com custos menores sem prejudicar o ambiente tem como opção a utilização do melhoramento genético das plantas e a utilização dos recursos biológicos, como a de bactérias promotoras do crescimento vegetal, que fixam nitrogênio para a planta e produzem hormônios de crescimento, como auxinas e giberelinas, estimulando o desenvolvimento do vegetal (DOBBELAERE e CROONENBORGHS, 2002).

Diferentes técnicas de adição de nutrientes através de fertilizantes no solo, são utilizadas para aumentar a produtividade. Um dos nutrientes presentes em grande quantidade nos fertilizantes é o nitrogênio (MALAVOLTA, 2006) que tem papel fundamental na planta. Ele que subsidia seu crescimento sendo um dos macroelementos mais utilizados por ela. É essencial na formação de compostos fundamentais para a manutenção da vida vegetal como aminoácidos e outros que são precursores de outras moléculas (PERRINE, 2007).

Naturalmente ele é encontrado no solo devido à matéria orgânica que foi decomposta, mas como sua quantidade não é ideal, a adubação faz-se necessária, sendo um dos insumos mais caros para plantas não leguminosas como o trigo. Além de pesquisas determinarem que mais de 65% do nitrogênio mineral proveniente de adubação ser perdido pela lixiviação, volatilização e escoamento (BHATTACHARJEE, 2008).

O processo de fixação pelo qual o nitrogênio atmosférico (N_2) pouco reativo é convertido em formas utilizáveis pela planta como a amônia (NH_3) é crucial para o

crescimento e produção. Acontece devido a reações químicas catalisadas por diferentes tipos de bactérias fixadoras conhecidas como diazotróficas que possuem a capacidade de utilizar apenas N_2 como forma de nutrição (PERIN, 2007).

O Nitrogênio é mineralizado no solo basicamente através de dois processos biológicos, a nitrificação que é a oxidação do NH_4^+ em NO_2^- e depois em NO_3^- por bactérias *Nitrossomonas* e *Nitrobacter*, e a amonificação que se resume no catabolismo de matéria orgânica em NH_4^+ (SCHLESINGER, 2012).

Estudos apontam que da emergência até a emissão da sexta ou sétima folha é o momento que a cultura do trigo precisa de maiores quantidades de nitrogênio em seu metabolismo (YANO et al., 2005).

Porém sua presença em excesso pode tornar-se prejudicial para a planta, já que o nitrogênio proporciona um aumento do crescimento da folha, conseqüentemente alterando negativamente sua taxa fotossintetizante devido a curvatura que ela adquire (MARSCHNER, 1995), além de levar ao acamamento que dificulta a colheita (TEIXEIRA et al., 2010).

Por outro lado, é encontrado relatos do comprometimento no crescimento e reprodução das plantas na falta de nitrogênio (CAZETTA et al., 2007).

Pesquisas sobre fixação biológica de nitrogênio acontecem em todo o mundo (CHAMAM et al., 2013). No Brasil, empresas como a EMBRAPA, através de pesquisadores como Mariângela Hungria, Rubens José Campo e outros cientistas pesquisam microrganismos e os fatores que podem iniciar a comunicação entre eles e as plantas (SANTOS e REIS, 2008).

Como fontes de pesquisas relacionadas com a FBN podemos citar autores conceituados e estudos feitos a décadas atrás como a inoculação de *Azospirillum*

spp. em trigo e sorgo avaliando o aumento expressivo na concentração de nitrogênio após a inoculação (DOBEREINER, 1990).

A facilidade de nodulação observada devido aos exsudatos da raiz de leguminosas (LI et al., 2016) na contribuição para a identificação de genótipos que expressam o fator Nod em cana-de-açúcar com o potencial para fixação biológica de nitrogênio (COELHO, 2003) e a inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura melhorando a concentração do mesmo na planta (ZILLI, 2008).

Mesmo em trabalhos com cultivares diferentes, fica evidente que a quantidade de nitrogênio total na planta foi significativamente maior após as inoculações de agentes promotores de comunicação em todos os trabalhos.

A interação entre esses microrganismos e a planta não acontece ao acaso, ela precisa ser sinalizada (BAIS et al., 2006). O vegetal desenvolve métodos específicos para tal, como por exemplo, a liberação de exsudatos pelas raízes em contato com o solo onde os microrganismos se encontram naturalmente, reconhecidamente dentre esses exsudatos podemos descrever os compostos orgânicos, como malato, polissacarídeos, fitoalexinas, mas principalmente os flavonoides (KOBAYASHI et al., 2004).

Para que essa fixação ocorra, uma sequência de eventos coordenados pela planta deve acontecer culminando com uma relação simbiótica caracterizada pela perfeita integração morfológica, bioquímica e funcional da associação entre a planta e o microorganismo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Muitos processos envolvidos na comunicação química da associação, fatores que definirão a penetração na célula e a colonização da raiz, tem sido elucidado nos últimos anos. No entanto, os

mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento e funcionalidade desses microrganismos são em grande parte desconhecidos.

Hoje reconhecemos como efeitos desses organismos sobre as plantas, o fornecimento de fitormônios de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas (EL-KHAWAS e ADACHI, 1999). Esses compostos auxiliam o crescimento da raiz e da parte aérea do vegetal aumentando a captação de nutrientes pela planta (ANTOUN et al., 1998; ASGHAR et al., 2002).

Além disso, estas bactérias também contribuem indiretamente para o desenvolvimento da planta através da produção de diversos antibióticos ou outros mecanismos de biocontrole, os quais inibem o crescimento de diversos microrganismos considerados fitopatogênicos (GRAY, 2005).

Existem três maneiras de classificarmos bactérias promotoras de crescimento em plantas que são definidas pela sua proximidade com a raiz, (GRAY, 2005) são elas: Rizobactérias extracelulares ou rizosféricas, identificadas como os microrganismos que se encontram circundando as raízes, encontradas na rizosfera da planta; Rizobactérias Endofíticas, aquelas que adentram nos espaços intercelulares e lá se fixam; Rizobactérias intracelulares, aquelas que se fixam no interior das células da planta ocasionando os nódulos, entretanto não sendo identificada pela planta como um patógeno (PÜHLER et al., 2004).

Além da classificação de acordo com a proximidade com a raiz pode-se classificar o seu grau de associação (GRAY, 2005). Podem existir três tipos de interação de uma planta com bactérias: simbiótica, fitopatogênica e associativa.

A interação simbiótica é caracterizada pela formação de nódulos nas raízes, ocasionado pelas bactérias intracelulares. O resultado é que o microrganismo fixa o nitrogênio atmosférico posteriormente utilizado pela planta. Nessa interação

simbiótica encontramos principalmente as bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Bradirhizobium* basicamente nodulando leguminosas (PÜHLER et al., 2004).

Pelo modo fitopatígeno os microrganismos usam diferentes formas para invadir o hospedeiro como adesinas (complexos proteicos que se ligam a receptores específicos), fatores de sinalização bacteriana, receptores de fatores externos ou derivados de plantas, e se suprem da planta para sua nutrição, sem que a reciprocidade ocorra efetivamente (FRANCIS et al., 2002).

Na interação associativa, o microrganismo se beneficia sem causar dano a planta ou mesmo a célula (QUISPEL, 1992), ele pode ser encontrado no próprio exsudato, no solo ou ser endofítico, ocorrendo reciprocidade quando o microrganismo inibe patógenos ou estimula o crescimento da planta (PÜHLER et al., 2004).

Estes exsudados são basicamente compostos fenólicos (flavonóides) e betaínas que, quando liberados no solo, são percebidos pelas bactérias presentes e desencadeiam interação (KRISHNAN et al., 1995).

Como exemplos de microrganismos associativos temos as bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* conhecidas como diazotrófica endofíticas, pois fixam nitrogênio sem causar nódulos espalhando-se pelos tecidos da planta sem induzir resposta de defesa, o que acontece em gramíneas como o trigo (BALDANI et al., 1986).

Por não resultar na formação de nódulos, como acontece em leguminosas, essa associação entre bactérias e gramíneas como o trigo não é tão eficaz quando a quantidade de nitrogênio fixada é analisada. Por ser muito baixa, faz-se necessário o

complemento nutricional por meio da adubação nitrogenada que se administrada incorretamente pode ser prejudicial ao solo.

Estudos apontam novos microrganismos capazes de aumentar a fixação de nitrogênio em gramíneas com o trigo como os gêneros *Azotobacter* e *Beijeinckia*, *Azospirillum* (BALDANI e BALDANI, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006) o que diminui a necessidade de adubação nitrogenada em até 50%, acarretando rendimento superior devido ao aumento da capacidade da planta de associar o nitrogênio e do menor custo a implantação do cultivar (HUNGRIA, 2005).

Estirpes de *Azospirillum* usadas como inoculante em cultura de arroz foram capazes de promover crescimento de produção de grãos em casa de vegetação de 32 a 81%. Os resultados são dependentes da espécie utilizada e proporcionaram um aumento de 22% na produção em relação ao controle sem a inoculação, em condições de campo (EL-KHAWAS e ADACHI, 1999) *Azospirillum* é uma fonte natural de auxinas para gramíneas e, portanto, com grande interesse agrícola.

Kennedy et al. (2004) demonstraram que o *Azospirillum* pode penetrar na raiz para crescer internamente nas células como uma bactéria endofítica.

2.3 FLAVONOIDES

Atualmente existem cerca de 4 mil flavonoides já identificados. São metabólitos especiais amplamente encontrados na natureza. Os flavonoides são identificados como metabólitos secundários (CHAMAM et al., 2013). Eles se encontram geralmente em raízes, folhas, flores, e frutos apresentando concentrações (FLAMBÓ, 2013).

Os flavonoides são estudados em diferentes áreas, sendo identificados em trabalhos com diferentes espécies, um breve levantamento foi efetuado levando em

consideração o flavonoide encontrado e a planta da qual foi reconhecido presentes na TABELA 1.

Tabela 1 - LEVANTAMENTO DE FLAVONOIDES

FLAVONOIDE	ESPÉCIE VEGETAL
Luteolina	Medicago sativa
Dihidroxi flavona	Trifolium repens
Flavanona, medicarpina, Homopterocarpina	Platymiscium floribundum
Genisteina	Soja
Formononetina, Biocanina	milho
C-glicosilflavonas	plantas da família Poaceae
Saponinas, antrquinona	Cenchrus echinatus - família Poaceae

FONTE: O autor (2017).

Estas concentrações podem ser alteradas por fatores como, por exemplo, raios UV, estações do ano, estresse hídrico, patógenos e poluentes que dependendo de sua incidência alteram o metabolismo da planta (NIJVELDT et al., 2001).

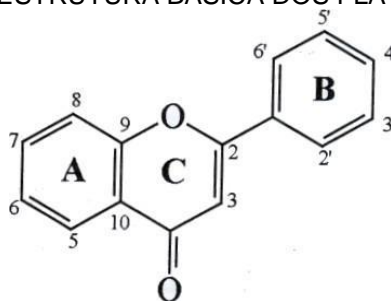
As funções básicas para essas substâncias são a proteção UV, ação inibidora de diversas espécies oxidantes como ânion superóxido (O_2), radicais hidroxil e peroxi sendo eficazes antioxidantes (SANDHAR et al., 2011), ação antibacteriana (MISHRA et al., 2013) além de desenvolver ação sinalizadora entre microrganismos fixadores de nitrogênio e a planta (FERRERES et al., 2009; MARKHAM et al., 1998; QIU et al., 2009).

Ocorridas essas alterações metabólicas, as atividades biológicas das plantas podem ser afetadas positiva ou negativamente, interferindo na fisiologia e alterando a taxa fotossintetizante, o comportamento estomatal, quantidades de substâncias de

reservas, expansão foliar e conseqüentemente o crescimento (GOBBO e LOPES, 2007).

Quimicamente os flavonoides são compostos aromáticos hidrossolúveis com estrutura básica de 3 anéis fenólicos (A, B e C) (TAPAS et al., 2008) (FIGURA 1), formados por 15 carbonos, sendo que o anel C é composto por um heteroatomo (AGUIAR et al., 2007).

Figura 1- ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.



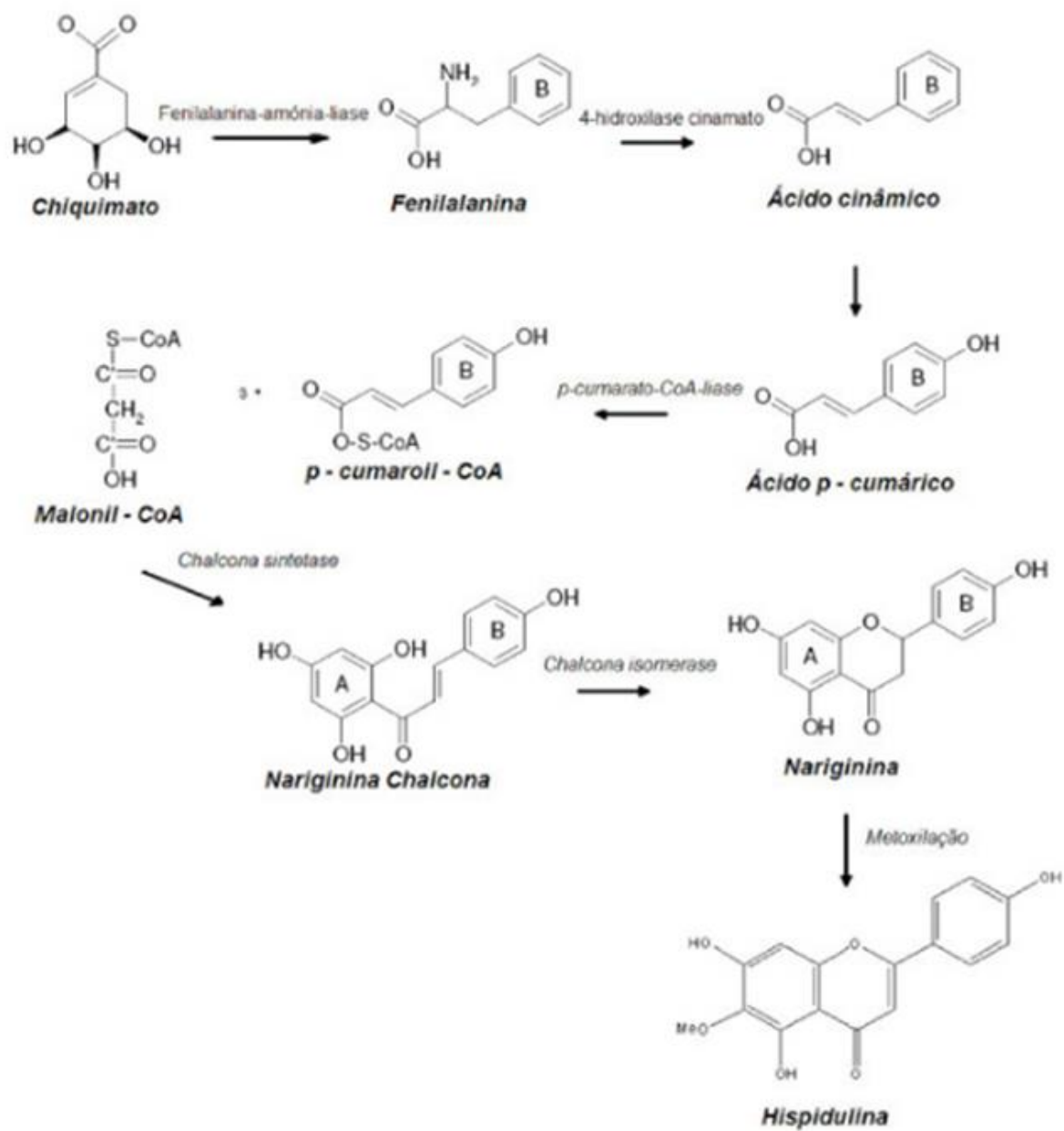
FONTE: AGUIAR et al., 2007.

Nas plantas, os flavonoides são sintetizados através da rota biosintética do chiquimato e do acetato (LATEIF et al., 2012), produzidos a partir de fenilalanina e malonil-CoA e diferem entre si pela composição das ligações desses anéis aromáticos, onde se pode encontrar diferentes substituintes (hidroxil, metil, glicosil). (HASSAN e MATHESIUS, 2012).

Como primeiro passo na via do flavonóide a fenilalanina é desaminada para produzir ácido cinâmico pela ação da fenilalanina-amônia-liase (PAL). O ácido cinâmico é hidroxilado pela cinamato-4-hidroxilase em ácido p-cumárico, que é então transformado em p-cumaril-CoA pela ação da CoAliase. A chalconasintetase catalisa a união de três unidades de malonil-CoA com uma de p-cumaroil-CoA para originar a naringeninachalcona. A naringeninachalcona é convertida em naringenina pela chalconaisomerase. Como visto no esquema da rota flavonoides na FIGURA 2.

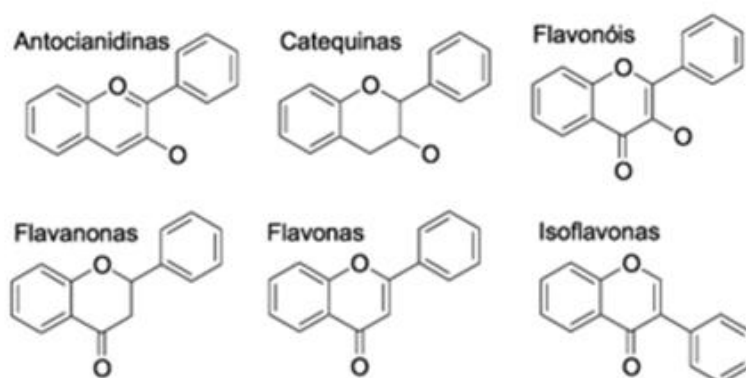
O Anel aromático liga-se com o carbono seis do anel C, que na posição 2 carrega um grupo fenil como substituinte, o anel B, sendo a pirona responsável pela formação da maioria das classes existentes, recebendo a denominação de núcleo 4 – oxo – flavonoide (SANDHAR et al., 2011; MARÇO et al., 2008). Algumas classes são formadas de acordo com o grau de oxidação do anel C, como os exemplos apresentados na FIGURA 3 e TABELA 2.

Figura 2 - ROTA BIOQUÍMICA DOS FLAVONOIDES.



FONTE: MARQUES et al., 2008.

Figura 3 - PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES.



FONTE: MARÇO et al., 2008.

Tabela 2 - SUBCLASSES E CARACTERÍSTICAS DOS FLAVONOIDES

CLASSE	LIGAÇÃO ANEL B COM C	GRUPO NO ANEL C	EXEMPLOS
Flavonóis	2	3-hidroxi 4-oxo	Quercitina Rutina
Flavona	2	4-oxo	Luteolina Apigenina
Flavonona	2	4-oxo	Hesperidina Narigenina
Flavana	2	3-hidroxi	Catequina Epicatequina
Isoflavonides	3	4-oxo	Daidzeina Ginesteina
Antocianinas	2	3-hidroxi	Cianidina Delfinidina

FONTE: Adaptado de BEECHER, 2003.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESPÉCIE VEGETAL

Para este trabalho foi escolhido uma cultivar de trigo amplamente utilizada na região oeste do Paraná. Optou-se pela CD 150 de ciclo precoce, definida como planta baixa e de fertilidade média a alta, conhecida como padrão de trigo melhorador, alto potencial de rendimento de grãos e boa resistência ao acamamento, possuindo tolerância a seca (COODETEC, 2017). As sementes foram disponibilizadas pela empresa COODETEC da cidade de Cascavel.

3.2 PREPARO DAS SEMENTES

A assepsia das sementes foi realizada com hipoclorito em concentração de 1% sob agitação por 3 minutos e lavagem com água deionizada e esterilizada por 6 vezes consecutivas, seguido por desinfecção com álcool 70% em agitação por 1 minuto e lavado com água deionizada e esterilizada por 6 vezes consecutivas, adaptado de (ZORATO, 2001).

As sementes passaram por teste de germinação após a assepsia, seguindo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram avaliadas 3 alíquotas de 50 sementes, tendo como resultado plântulas normais apresentando estruturas integras.

3.3 MICRORGANISMOS

Os microrganismos selecionados de bancos de culturas da EMBRAPA e UFPR foram cultivados em meio Dygs (Dextrose Yeast Glucose Sucrose) e YM

(Yeast Malt Extract) com quantificação realizada por Turbidimetria em espectrofotômetro.

Os microrganismos utilizados, local de origem e pesquisador cedente foram o *Azospirillum brasiliense* do banco de culturas bacterianas da Embrapa soja cedida pela pesquisadora Dra. Mariângela Hungria; *Herbaspirillum seropedicae* proveniente do banco de culturas bacterianas da UFPR cedida pelo. prof. DR. Fábio Pedrosa; *Enterobacter* sp. estirpe nº 203, 208 e 493 do banco de culturas bacterianas da UFPR Setor Palotina cedida pela prof. Dra. Luciana Grange.

3.4 PREPARO DOS TRATAMENTOS

O substrato escolhido para o procedimento de plantio das sementes de trigo foi a areia por se tratar de um material inerte, facilmente esterilizável, baixo custo, sem interferência nutritiva para com a solução utilizada como provedora de macro e micronutrientes (OLIVEIRA et al., 2012). O material possuía granulometria média e foi peneirado e esterilizado em autoclave.

O plantio das sementes de trigo cultivar CD 150, devidamente tratadas realizou-se em vasos de plástico de cor preta com 20cm de altura e 12cm de diâmetro, previamente esterilizados em autoclave e preenchidos com a areia já esterilizada.

Foram realizados 8 tratamentos com 4 repetições, sendo eles os seguintes:

Tratamento 1: *Azospirillum brasiliense*; Tratamento 2: *Herbaspirillum seropedicae*; Tratamento 3: *Azospirillum brasiliense* em conjunto com *Herbaspirillum seropedicae*; Tratamento 4: *Enterobacter* sp. estirpe nº 203; Tratamento 5:

Enterobacter sp. estirpe nº 208; Tratamento 6: *Enterobacter* sp. estirpe nº 493; Tratamento 7: testemunha com adição de nitrogênio; Tratamento 8: testemunha sem adição de nitrogênio.

Os tratamentos foram realizados dia 27 de maio de 2016 e levados a casa de vegetação onde foram mantidos em temperatura (25°C±2°C) e umidade (60%) controlada, sendo utilizada como fonte nutritiva soluções com 0mg L⁻¹ e 50mg L⁻¹ de nitrogênio, contendo nutrientes de acordo com a TABELA 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 - SOLUÇÃO NUTRITIVA UTILIZADA NO EXPERIMENTO COM AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO (0 mg L⁻¹)

REAGENTE	mg L ⁻¹	P	K	Ca	Mg	S	Cl
		mg L ⁻¹					
Sulfato de Magnésio	530				50,35	68,90	
Fosfato de Potássio	250	57,5	72,50				
Cloreto de Cálcio	550			149,65			265,30
Cloreto de Potássio	340		176,80				159,80
Micronutrientes*	1 ml						

* g 100mL⁻¹ (FeEDTA-4,21; ZnSO₄-0,32; H₃BO₃-0,12; CuSO₄-0,50; Na₂Mo 4-0,015; MnSO₄.H₂O-1,01)

FONTE: Adaptado de BUGBEE (2003).

Tabela 4 - SOLUÇÃO NUTRITIVA UTILIZADA NO EXPERIMENTO COM 50 mg L⁻¹ DE NITROGÊNIO

REAGENTE	mg L ⁻¹	N	P	K	Ca	Mg	S	Cl
		mg L ⁻¹						
Nitrato de Potássio	357	49,98		130,30				
Sulfato de Magnésio	530					50,35	68,90	
Fosfato de Potássio	250		57,50	72,50				
Cloreto de cálcio dihidratado	550				149,65			
Cloreto de Potássio	10			52,00				47,00
Micronutrientes*	1 ml							

* g 100mL⁻¹ (FeEDTA-4,21; ZnSO₄-0,32; H₃BO₃-0,12; CuSO₄-0,50; Na₂Mo 4-0,015; MnSO₄.H₂O-1,01)

FONTE: Adaptado de BUGBEE (2003).

O experimento foi retirado da casa de vegetação após 42 dias do plantio. A areia foi removida cuidadosamente e peneirada para que todas as raízes fossem utilizadas.

Posteriormente as raízes foram lavadas com água destilada e separadas da parte aérea na porção próxima ao colo da planta (NOVARETTI, 2011). As medições das raízes foram realizadas com auxílio de uma régua e logo após, secas por 72 horas a 45°C em estufa com circulação e renovação de ar. Todas as raízes foram pesadas em balança analítica e reservadas.

3.5 EXTRAÇÃO

Macerou-se em cadinho com ajuda de pistilo até pulverização as raízes de todos os tratamentos, estas foram pesadas e uma alíquota de 300 mg de cada raiz foi submetida a refluxo por 15 minutos utilizando 50 ml de álcool 70% como solvente. O resultado foi filtrado em papel qualitativo e armazenados em frascos âmbar na geladeira (CHABARIBERI, 2009).

3.6 ESPECTROFOTOMETRIA

3.7.1 Curva analítica espectrofotometria

A curva constituiu-se de 10 pontos. As concentrações utilizadas foram 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 8,0 e 10 mg mL⁻¹ do padrão de Quercitina, onde a equação da reta apresentou um R² acima de 0,999, usando como diluente álcool 70%, adaptado (LIN e TANG, 2007).

3.6.1 Preparo das amostras espectrofotômetro

A cada 2mL das amostras adicionou-se 0,8 mL de álcool etílico 95%, 0,1 mL de cloreto de alumínio 10%, 0,1 mL de acetato de sódio 1 mol L⁻¹ e 2 mL de água

destilada. Deixou-se reagir por 40 minutos em ausência de luz. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, sendo substituído 2mL da amostra por 2 mL de álcool 70% (adaptado de LIN e TANG, 2007).

Fez-se leitura no espectrofotômetro (Espectro SP 2000UV BelFotonics) em comprimento de onda de 415nm (LIN e TANG, 2007).

3.7 HPLC

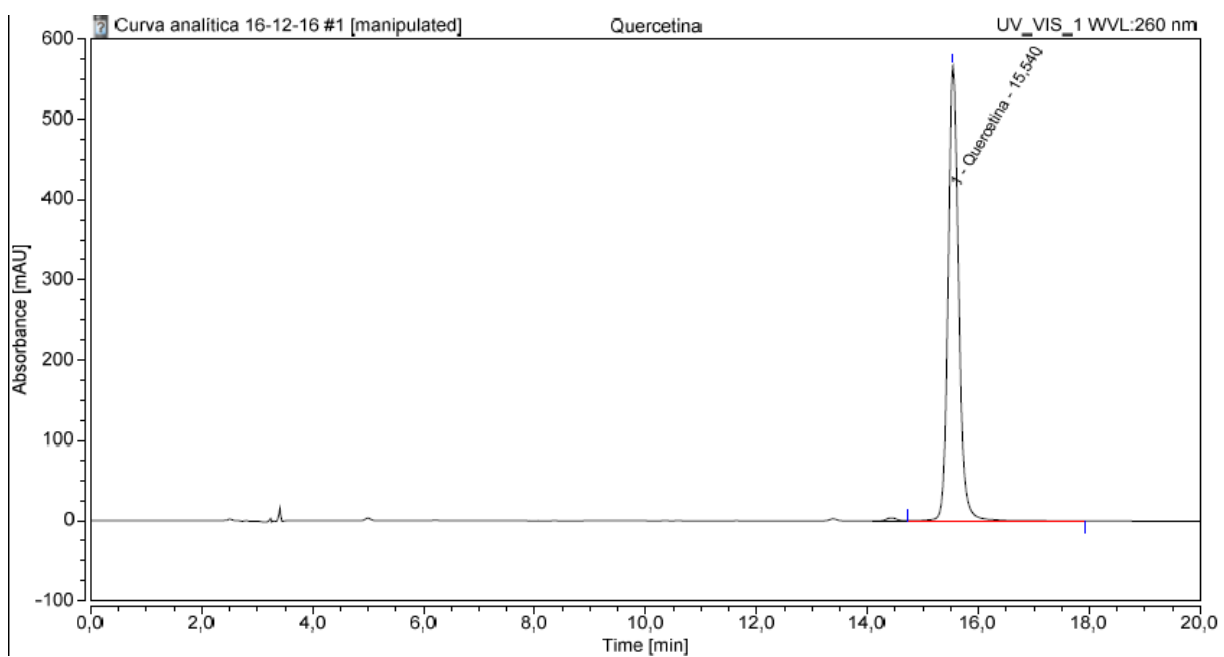
3.7.1 Curva analítica HPLC

A curva analítica foi constituída de 4 padrões analíticos: Cumarina, Quercitina, Isoflavona e Rutina, escolhidos por se apresentarem com mais intensidade em diferentes espécies de plantas (VELOSO et al., 2012), diluídos em metanol:água (70:30). Para formulação de padrão estoque foi pesado cerca de 25 mg e diluídos em 25 mL do diluente citado. A curva foi composta por 8 pontos de concentração distintas diluídos em metanol:água (70:30), sendo: 0,2 mg/L; 0,4 mg/L; 1 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 50 mg/L; 70 mg/L; 100 mg/L.

As diluições foram filtradas em membrana PVDF (membrana de fluoreto de polivinilideno) e inseridas em vial's estéreis. A equação da reta apresentou um R^2 acima de 0,998 em todos os casos. As leituras foram realizadas em CLAE e a curva analítica foi construída a partir do programa Microsoft Excel, no qual foi efetuada a regressão linear e obtida a equação da reta [$y = a + bx$] relacionando concentração dos padrões versus a área de cada pico observado.

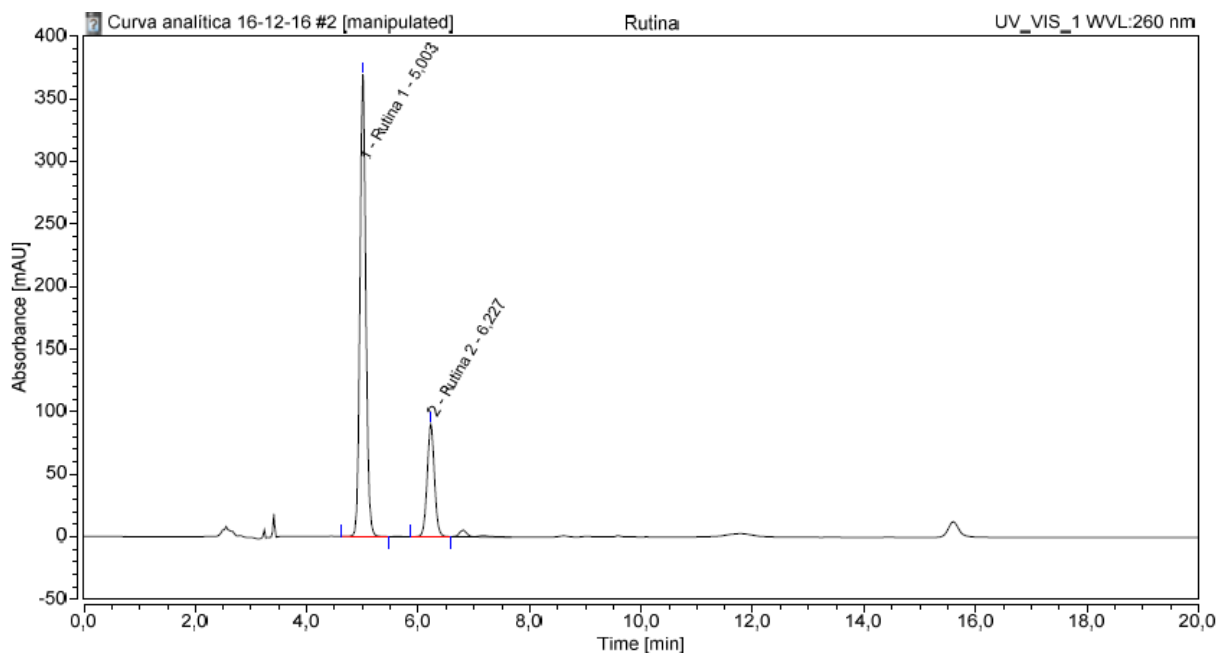
Abaixo seguem os cromatogramas dos padrões analíticos testados respectivamente Quercitina, Rutina, Cumarina e Isoflavona (FIGURA 4, FIGURA 5, FIGURA 6 e FIGURA 7).

Figura 4 - CROMATOGRAMA QUERCITINA

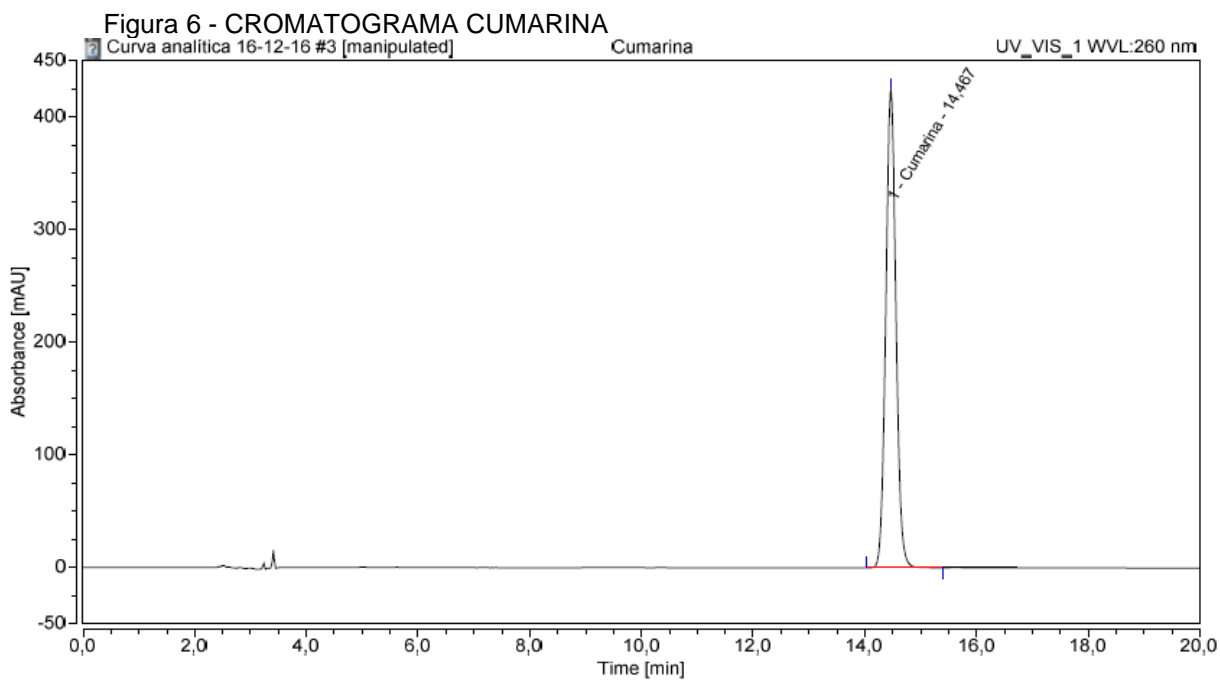


FONTE: O autor (2017).

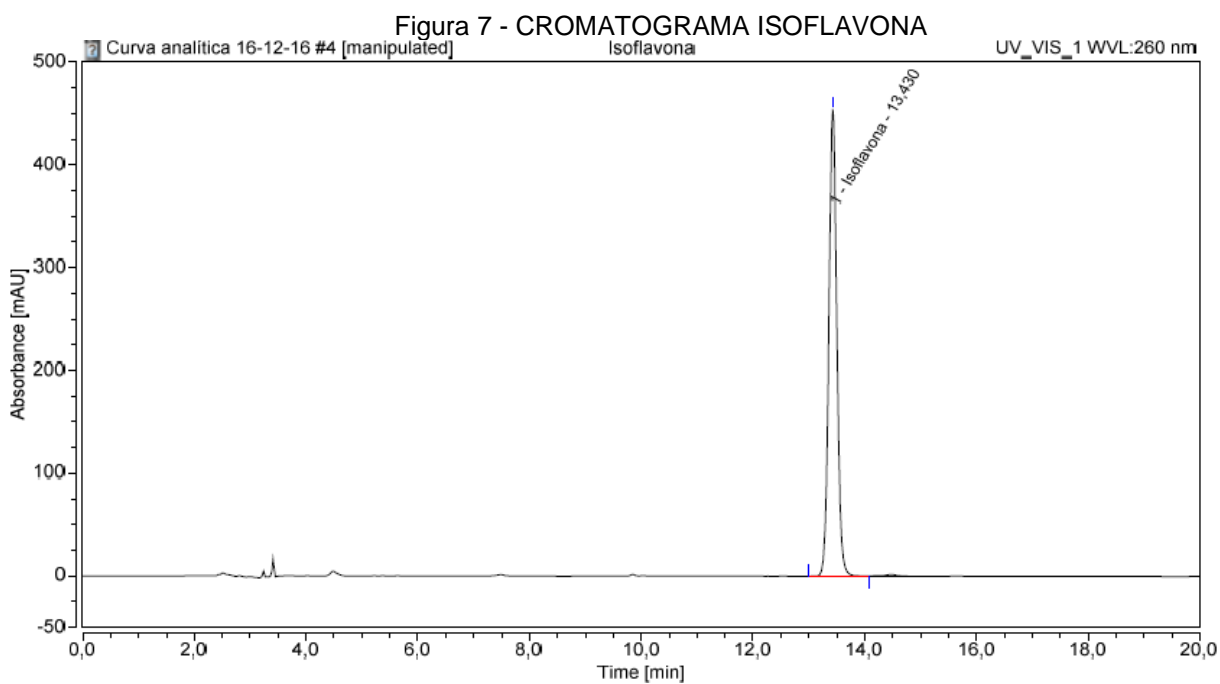
Figura 5 - CROMATOGRAMA RUTINA



FONTE: O autor (2017).



FONTE: O autor (2017).



FONTE: O autor (2017).

3.7.2 Preparo das amostras HPLC

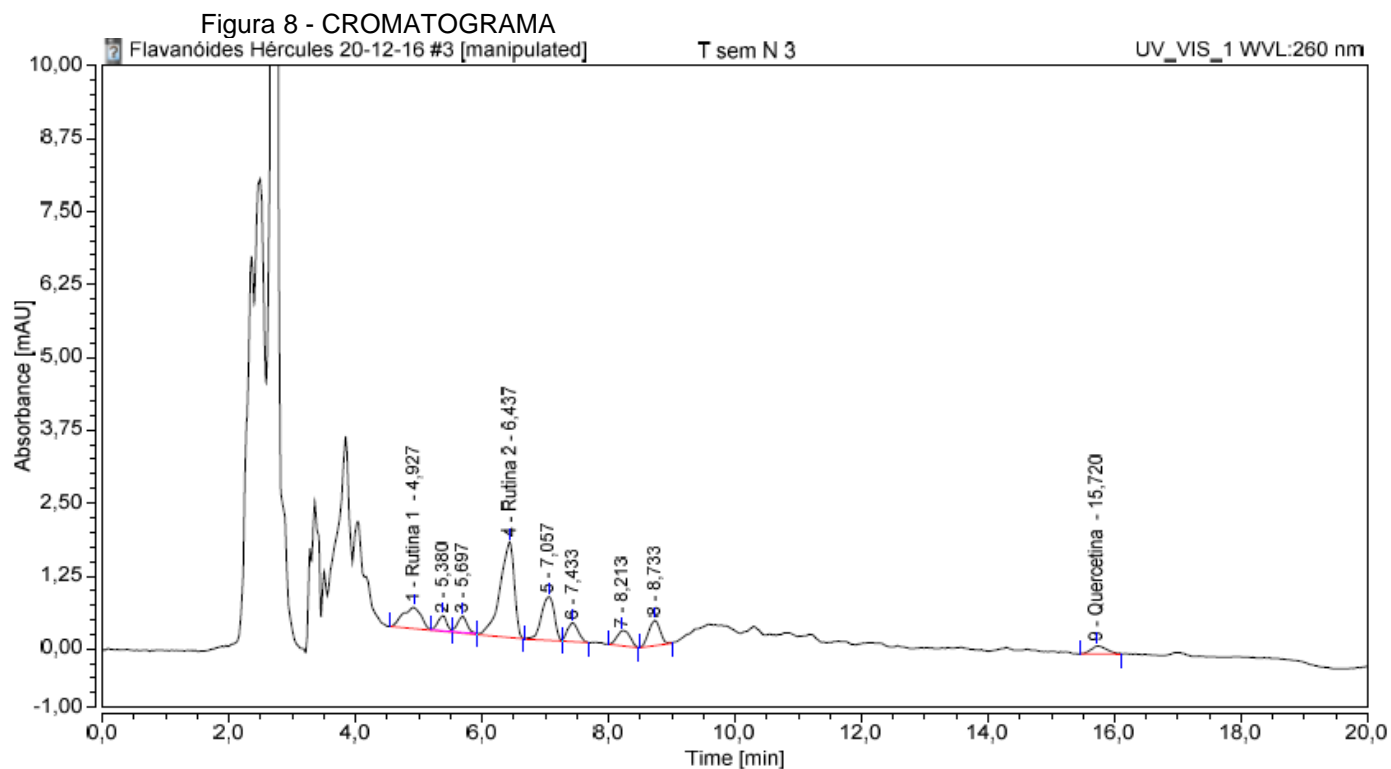
As amostras de todos os tratamentos foram filtradas com filtro PVDF (membrana de fluoreto de polivinilideno) e inseridas em vial's estéreis para análise em HPLC marca Termocientific modelo ultimate 3000 versão de software chromelion 7.1.

Para a realizações das análises no HPLC foram utilizadas as seguintes definições adaptadas de Muller (2006) e Sobrinho (2010):

Sistema gradiente: ACN:H₃PO₄ (M:V) (Ph₂,75) 0-5 min ACN 22%, 5-6 min ACN 29%, 6-15 min ACN 29%, 15-16 min ACN 22%, 16-20min ACN 22%.

Coluna utilizada foi a Phenomenex c18 25 cm x 4,6 mm x 5 µm, com volume de injeção da amostra: 20µL, o fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min, com pressão de sistema em 1800 PSI, e um tempo de corrida da amostra de 20 min a 30°C, utilizando detector UV-VIS a 260nm. Gerando cromatogramas como o exemplo apresentado na FIGURA 8.

Os cromatogramas foram tratados de acordo com as práticas usuais de integração de picos para melhor visualização pelo software do aparelho.



FONTE: O autor (2017).

3.8 TESTES ESTATÍSTICOS

O teste t foi utilizado para comparar as médias dos tratamentos para as variáveis agrônomicas e concentração de flavonoides totais. As análises foram realizadas ao nível de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$) pelo programa Sisvar (FERREIRA 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 FLAVONOIDES

A tabela 5 abaixo expressa as quantidades de flavonoides totais encontradas pela quantificação em espectrofotômetro UV e a quantidade de Quercitina e Rutina relatadas após a quantificação em espectrofotômetro de alta eficiência (HPLC).

Tabela 5 - VALORES DE FLAVONOIDES TOTAIS, PORCENTAGEM DE QUERCITINA E RUTINA EM RELAÇÃO AO TOTAL (CD150)

TRATAMENTOS	(µg g ⁻¹ de raiz)				
	FLAVONOIDES*	QUERCITINA	%**	RUTINA	%
<i>Azospirillum</i>	0,4270 abc	0,0120	2,8	0,0115	2,7
<i>Herbaspirillum</i>	0,3964 bc	0,0110	2,8	0,0205	5,2
<i>Herbaspirillum</i> + <i>Azospirillum</i>	0,4314 abc	0,0115	2,7	0,0302	7,0
<i>Enterobacter</i> sp. nº203	0,5044 a	0,0110	2,2	0,0278	5,5
<i>Enterobacter</i> sp. nº208	0,4679 ab	0,0120	2,6	0,0131	2,8
<i>Enterobacter</i> sp. nº493	0,4935 a	0,0110	2,2	0,0166	3,4
Testemunha N+	0,3829 c	0,0110	2,9	0,0205	5,4
Testemunha N-	0,4568 abc	0,0125	2,7	0,0201	4,4
CV (%)	12,32				
Média	0,4455				

* Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t (p>0,05).

** % de Quercitina e Rutina em observação aos flavonoides totais.

FONTE: O autor (2017).

O valor médio de flavonoides encontrado neste trabalho foi de 0,4455 µg g⁻¹ de raiz (tabela 4). Os tratamentos que apresentaram maior média foram *Enterobacter* sp. nº 203 e 493, diferindo-os estatisticamente apenas da Testemunha N+ e *Herbaspirillum*. A Testemunha N+ também apresentou diferença estatística da inoculação com *Enterobacter* sp. nº 208 (tabela 5).

A análise feita em HPLC conseguiu quantificar os teores de quercitina e rutina que correspondem dentro da concentração de flavonoides totais da raiz da planta com uma porcentagem que varia para quercitina de 2,2 a 2,9% e para rutina de 2,7 a 7,0%, dependendo do tratamento.

Os valores de quercitina para todos os tratamentos correspondem a uma média de 2,55% dos flavonoides totais, já para rutina esses valores tiveram diferenças acentuadas, como é o caso do tratamento com *Azospirillum* que alcançou 2,7% e *Azospirillum* em associação com *Herbaspirillum* alcançando 7,0% dos flavonoides totais da raiz da planta de trigo (tabela 5).

Pela falta de trabalhos que avaliam a quantidade de flavonoides nas raízes das planas não foi possível um comparativo entre espécies e seu crescimento em detrimento da quantidade dos flavonoides, porém, trabalhos que envolviam quantificar ou analisar sua eficácia são encontrados na literatura e levam a formular hipóteses de sua importância para as gramíneas.

Os flavonoides, como a quercitina e rutina, estão relacionadas com o transporte de auxina, que afetam o desenvolvimento da planta (TAYLOR e GROTEWOLD, 2005) podendo ser, portanto, considerados reguladores endógenos do transporte de auxina (LAKHANPAL, 2007).

Os flavonóides exercem diversos papéis nas plantas, como exemplo protegê-la do estresse oxidativo, já que são reconhecidos como estruturas que sequestram radicais livres não somente em plantas (AGATI e TATINNI, 2010).

Possivelmente o solo arenoso utilizado como substrato tenha sido reconhecido estranhamente pelo trigo, além da falta do nutriente nitrogênio essencial para o crescimento da planta, pode ter induzido a formação de espécies reativas de

oxigênio, causando dessa forma, aumento do nível de quercitina e rutina, em efeito protetor contra os danos oxidativos (PRADO, 2014).

Santos (2015) aplicando diferentes doses de formononetina e de fósforo (0, 25, 50 e 100 g ha⁻¹) do produto comercial PHC-506, na forma de pó (sal de potássio 7-hidroxi, 4'- metoxi-isoflavona) com o intuito de aumentar a densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas na rizosfera de plantas de milho, tentou provar a eficácia do flavonoide na melhoria da quimiotaxia e conseqüentemente a fixação de nitrogênio pela planta, porém, não obteve resultados significativos considerando como resultado negativo.

Por outro lado, Paim (2012) testando doses de flavonoide formononetina em milho e soja, comprovou a melhora na comunicação de fungos arbusculares, mas não em bactérias fixadoras, reforçando que os flavonoides melhoram a comunicação da rizosfera como um todo não apenas de bactérias.

A gramínea *Rhynchely trumrepens* foi analisada por Paula (2013) para fins farmacêuticos através de cromatografia, método pelo qual encontrou flavonoides c-glicosilados em extrato aquoso da parte aérea, em concentrações de 0,29 mg g⁻¹ de massa seca da planta, resultados muito acima dos encontrados na raiz do trigo.

Cooper (2007) estudando *Medicago sativa* descobriu em sua composição o flavonoide Luteolina liberado como exudato pela planta e utilizado para comunicação com bactérias fixadoras de nitrogênio. Cooper (2004) analisou aproximadamente 30 flavonóides indutores de gene *nod* que foram isolados de nove gêneros de leguminosas. Foram reconhecidos muitos flavonoides, entre eles as chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas e cumarinas, relatando que encontrou quantidades extremamente baixas como microgramas ou mesmo nanogramas (sem citar valores), o que corresponde ao encontrado no atual trabalho.

Em alguns casos flavonoides podem atuar como indutores de certos rizóbios e anti-indutores para outros (BEGUM et al., 2001). Como é o caso das isoflavonas daidzeína e genisteína, que são indutores para *B. japonicum* e *Rhizobium sp.* NGR234 mas anti-indutores para *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* e bv. *Viciae*, podendo talvez explicar a presença de flavonoides

As quantidades encontradas pela análise de HPLC pode ser relacionada com a possível incompatibilidade da cultivar com os tratamentos já que Van Brussel et al., (1990) estudando leguminosas relatam que a atividade indutora de genes responsáveis pela nodulação de exsudatos radiculares, pode ser induzida pela presença de rizóbio compatível na rizosfera.

Lage (2009) durante a determinação de compostos fenólicos, relata a presença de flavonoides em gramíneas forrageiras onde as concentrações ficaram em torno de 0,74 e 27,49 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de massa seca da parte aérea, e no geral as concentrações de ácidos fenólicos aumentaram nas gramíneas adubadas com o avanço da idade das plantas, o que poderia ser observado no presente trabalho caso fossem recolhidas amostras de tempos diferentes.

De acordo com seus dados os teores totais de polifenóis ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de polifenóis na MS) de gramínea "Coastcross" adubada foi de 578,1 mg já a análise com a planta não adubada foi de 511,0 mg como considerou a rizosfera natural, sem nenhum tipo de biofertilizante, considera-se que a planta estava sob influência de diferentes tipos de bactérias e fungos que possivelmente influenciaram na dosagem observada. Sob observação individual dos flavonoides encontrados, percebeu-se a presença de catequina na concentração de 4,09 $\mu\text{g mg}^{-1}$ e de epicatequina com 31,92 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de MS (LAGE, 2009).

Já Veloso (2011) na determinação de novos flavonóides da raiz e caule de *Platymiscium floribundum* Vog. encontrou medicarpina, homopterocarpina, isoliqueritigenina, cumarina, flavanona e chalcona sem relatar concentrações em ambos os órgãos da planta.

Encontrando flavonoides em sua análise fitoquímica das cascas e do miolo da raiz de urtiga-brava, Gindri (2010), encontra uma concentração de 16,42 mg g⁻¹ de flavonoides totais que pode reafirmar que são exudatos produzidos pela planta no sentido raiz rizosfera.

Chaurasia e Wichtl (1987) isolaram flavonóides glicosilados das flores da *Urtica dióica* (Urticaceae), planta da mesma família de *U. baccifera*.

Akbay et al. (2003) isolaram quercetina, canferol e isoramnetina da mesma planta. Os resultados obtidos por estes autores reafirmam a positividade para flavonóides obtida neste trabalho.

4.2 VARIÁVEIS AGRONÔMICAS

Houve diferença estatística entre os tratamentos para o comprimento da raiz (TABELA 6). Os tratamentos nomeados conjunto A (*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, Testemunha N+ e N-) não apresentaram diferença entre si, assim como o chamado conjunto B (*Azospirillum*+*Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Enterobacter* sp. 203, 208, 493, *Herbaspirillum* e Testemunha N+). Porém nota-se que o conjunto A apresenta médias maiores e dentre elas destaca-se a Testemunha N- (48,87cm).

Tabela 6 - VALORES MÉDIOS DAS VARIÁVEIS AGRONÔMICAS ESTUDADAS

TRATAMENTOS	VARIÁVEIS			
	COMPRIMENTO DE RAIZ*(cm)	MASSA SECA DE RAIZ(g)	COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA(cm)	MASSA SECA DA PARTE AÉREA(g)
<i>Azospirillum</i>	39,67 ab	0,5835 b	29,57 c	54,7500 ab
<i>Herbaspirillum</i>	38,92 ab	0,5274 bc	29,90 bc	49,0000 b
<i>Herbaspirillum</i> + <i>Azospirillum</i>	34,50 b	0,4071 cd	32,50 ab	46,6667 bc
<i>Enterobacter</i> sp. nº 203	32,50 b	0,4178 cd	32,75 a	51,2500 ab
<i>Enterobacter</i> sp.nº 208	29,87 b	0,5610 b	29,90 bc	54,7500 ab
<i>Enterobacter</i> sp.nº 493	31,37 b	0,3695 d	34,25 a	50,5000 b
Testemunha N+	39,35 ab	0,8282 a	29,37 c	60,2500 a
Testemunha N-	48,87 a	0,3944 cd	29,00 c	37,5000 c
CV (%)	20,65	17,67	6,05	12,52
Média	36,96	0,5154	30,85	50,7097

* Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste t.

FONTE: O autor (2017).

Pode-se analisar que apesar de não diferir estatisticamente com relação a alguns outros tratamentos, a testemunha N- foi a que demonstrou maior comprimento médio das raízes (48,87cm). Isso acontece pela deficiência do

nutriente, pois as plantas são capazes de perceber o Nitrogênio no solo e em seu próprio organismo, conseguindo alterar seu metabolismo (SAKAKIBARA, 2006).

A baixa disponibilidade de nutrientes como o nitrogênio pode ser situação comum favorece o estiolamento e restringe o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, que usam de mecanismos para sair deste tipo de estresse.

Algumas das respostas são locais, aplicadas nas raízes com a finalidade de melhorar a capacidade de exploração do solo e conseqüentemente o potencial para extração dos nutrientes (DA SILVA e DELATORRE, 2014), enquanto outras são sistêmicas, implicando em intrincadas rotas de percepção de nitrogênio (FORDE, 2002).

Zhang e Forde (1998) observaram que em *Arabidopsis* depois de uma mudança de concentração de NO_3^- de 1 para $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ocorreu uma grande variação no comprimento das raízes laterais com aumento de 300 %.

O aumento do alongamento e do número de raízes laterais e da densidade e pelos radiculares sob deficiência de N pode alterar significativamente o peso seco de raízes, já que a baixa disponibilidade desse nutriente no solo induz o crescimento radicular das plantas deixando suas raízes mais longas, porém mais finas e, tendendo a se expandir e explorar ao máximo o solo (MARTUSCELLO et al., 2006).

Percebe-se que em diferentes espécies existem diferentes reações, pois o peso seco da raiz pode aumentar caso a raiz se alongue e não afine ou pode diminuir caso aconteça, razão pelo qual a testemunha N- obteve maior média de comprimento de raiz, porém uma das menores média de massa seca de raiz (SOUZA et al., 2013),

A massa seca da raiz apresentou diferenças significativas entre tratamentos (TABELA 6).

O tratamento Testemunha N+ foi o que apresentou uma maior massa seca de raízes (0,8282g) e diferiu estatisticamente de todos os demais. Os tratamentos *Azospirillum* (0,5835g), *Herbaspirillum* (0,5274g) e *Enterobacter* sp. 208 (0,5610 g) não apresentaram diferença estatística entre si. O tratamento inoculado com a bactéria *Enterobacter* sp. 493 foi o que apresentou a menor massa seca de raiz (0,3695g), entretanto este não diferiu estatisticamente da Testemunha N-, *Enterobacter* sp. 203 e *Herbaspirillum* + *Azospirillum* (TABELA 6).

O fato da Testemunha N+ ter proporcionado uma maior massa seca de raízes em trigo, deve-se ao fato da presença do nutriente em alto teor no solo causar inibição do desenvolvimento de raízes laterais (ZHANG e FORDE, 2000) e estimular o metabolismo, proporcionando formação de proteínas e outros constituintes celulares.

É provado o efeito significativo da aplicação de nitrogênio em trigo e sua relação com o aumento de massa seca da raiz (SOUZA et al., 2013), onde houve máxima observação na dose de nitrogênio de 54,44 mg dm⁻³.

Infelizmente, a falta de estudos com trigo relacionados a doses de nitrogênio não permitiu comparações, mas em outras culturas é relatada influência do nitrogênio na produção de massa seca de raiz, tal qual observada em capim-xaraés com máxima produção de massa seca de raiz em doses de 159 mg dm⁻³ (RODRIGUES et al., 2007).

Na análise de comprimento da parte aérea da planta foi observado diferença estatística dos tratamentos *Enterobacter* sp. 203 e 493 que apresentaram as maiores médias, com os demais tratamentos. A estirpe número 493 apresentou a maior média dentre todos os tratamentos (34,25cm). Os tratamentos conhecidos como grupo B (*Azospirillum* + *Herbaspirillum*, *Herbaspirillum* e *Enterobacter* sp. 208)

apresentaram semelhança entre si e o grupo C (*Herbaspirillum*, *Enterobacter* sp. 203, 208, 493, Testemunha N- e N+) também não diferem se comparados entre si (TABELA 6).

Sabe-se que a presença de nitrogênio tem influência diretamente proporcional no crescimento vegetativo das plantas agindo na iniciação, expansão, número e tamanho final das folhas além de agir no alongamento do caule. Por essa razão pode também influenciar na análise do comprimento da parte aérea (SCHRÖDER et al., 2000) pressupondo-se assim que os tratamentos que apresentaram maior média podem ter mais eficiência na fixação de nitrogênio, como *Azospirillum + Herbaspirillum* e *Enterobacter* sp. 203 e 493.

Plantas que crescem com carência de nitrogênio apresentam baixa atividade meristemática da parte aérea então reservam nas raízes, grande parte dos produtos da fotossíntese, explicando as menores médias de crescimento da parte aérea para os tratamentos que não tiveram êxito ou não foram supridos com quantidades de nitrogênio adequadas (LEMAIRE et al., 1997).

Baixas concentrações de nitrogênio favorecem a redução do crescimento da biomassa da parte aérea e aumento da biomassa radicular para maximizar a capacidade da planta em absorver maior quantidade de nitrogênio do solo (CHUN et al., 2005).

Para Souza (2013) as maiores alturas de plantas de trigo ocorreram utilizando-se doses de nitrogênio compreendidas entre o intervalo de 120-180 mg dm⁻³, que em seu estudo foram as melhores doses de nitrogênio para o trigo, portanto, a taxa de fixação é uma possível explicação para o observado nos tratamentos avaliados neste trabalho.

No comparativo entre a massa seca da parte aérea de todos os tratamentos observa-se que o agora chamado conjunto A (*Azospirillum*, *Enterobacter* sp. nº 203, 208, e Testemunha N+) apresentaram médias estatisticamente iguais, sendo a Testemunha N+ a que apresentou maior média (60,25mg).

Resultados semelhantes foram observados em trabalhos com trigo e inoculação com *Azospirillum* na semente que causaram maiores acúmulos de massa seca da parte aérea (DIDONET et al., 1996).

Souza (2013) encontrou relação de quantidade de massa seca em relação a alta disponibilidade de nitrogênio para a planta.

Uma hipótese para explicar esse aumento é a maior disponibilidade de nitrogênio para a planta visto que a presença de nitrogênio em quantidades ideais atua sobre o metabolismo, proporcionando a formação de constituintes celulares que a planta tende a alocar na parte aérea em detrimento ao sistema radicular não necessitar ser tão desenvolvido como deveria na presença de nitrogênio (DA SILVA e DELATORRE, 2009).

Em estudos avaliativos de produção de massa seca da parte aérea do trigo (SOUZA et al., 2013) constatou-se seu aumento com aplicação de doses de nitrogênio com máxima produção em 165 mg dm^{-3} , também observado por Viana e Kiehl (2010), que encontraram máxima produção de massa seca na dose de nitrogênio de 251 mg dm^{-3} .

Baldani et al. (2000) avaliaram em casa de vegetação a contribuição de FBN de diferentes isolados de *H. seropedicae* *Burkholderia* sp. em diferentes cultivares em arroz sequeiro. Os resultados demonstraram que 90 estirpes estudadas levaram a um aumento de peso fresco das planta e massa seca de parte aérea.

Soares et al. (2009) obtiveram em média, em estudo com genótipos de milho submetidos a doses de nitrogênio, 2,77 de relação MSPA/MSR, sendo superior ao observado em Souza (2013) em que a relação foi de 2,06 MSPA/MSR. Em nosso estudo com trigo, os tratamentos que apresentaram maior relação MSPA/MSR foram *Enterobacter* sp 493 (136,7) e 203 (122,7). As menores relações foram apresentadas pela Testemunha N+ (72,7) e *Herbaspirillum* (92,9).

Ao observarmos o agora nomeado conjunto B composto pelos tratamentos *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* sp nº 203, 208 e 493, apresentaram médias estatisticamente iguais diferindo do conjunto C (Testemunha N- e da associação entre *Azospirillum* + *Herbaspirillum*) que apresentaram médias estatisticamente iguais, porém as menores do grupo (TABELA 6).

Observa-se que a Testemunha N- apresentou a menor média de todos os tratamentos. Uma hipótese para este resultado é a deficiência da obtenção de nitrogênio pela planta, desfavorecendo o crescimento e conseqüentemente a diminuição da massa da parte aérea (SCHRÖDER et al., 2000) como já inversamente provado anteriormente (VIANA e KIEHL, 2010).

Nas comparações entre os fatores conseguimos relacionar a maior média de comprimento de raiz da Testemunha N- e sua conseqüente perda de massa seca de raiz e diminuição de comprimento de parte aérea com a sua menor massa seca de parte aérea.

Relações ainda são observadas na Testemunha N+, onde estudos reforçam que a disponibilidade desse nutriente faz com que a eficiência da raiz se acentuasse não necessitando de raízes maiores, mas favoreceu a quantidade de raízes laterais influenciando na massa. O mesmo observa-se na parte aérea onde folhas e caules

maiores e mais densos influenciam na maior média de massas em estudos na cultura do milho (SCHRÖDER et al., 2000).

Para fortalecer a função dos flavonoides como exudatos que participam da quimiotaxia, trabalhos poderão ser feitos avaliando a produção e a eficácia de diferentes flavonoides na fixação de nitrogênio. Além analisar a eficiência de diferentes inoculações com microorganismos isolados ou suas associações.

5 CONCLUSÕES

Pode-se afirmar que o trabalho teve seus objetivos atingidos pois os flavonoides totais das raízes dos diferentes tratamentos foram quantificados e identificados tendo sido observados os polifenóis Rutina e Quercitina em todos os tratamentos em quantidades diferentes. Os tratamentos *Enterobacter* sp. 203 e 493 foram os que apresentaram maior concentração de flavonoides totais na raiz, desmontando a supermácia das bactérias nativas.

Os aspectos agronômicos foram avaliados e diferenças significativas foram observadas como descrito nos resultados e discussão, onde alguns tratamentos tiveram mais sucesso em melhorar aspectos como comprimento de raiz pela Testemunha N-, massa seca de raiz pela Testemunha N+, comprimento da parte aérea pelos tratamentos *Enterobacter* sp. 203 e 493 e massa seca da parte aérea pelo tratamento Testemunha N+.

Conclui-se, todavia, que nenhum tratamento isolado foi substancialmente o mais viável para a planta no quesito quimiotaxia/FBN conseguindo melhorar todos os aspectos agronômicos.

REFERÊNCIAS

- AGATI G., TATTINI M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytol**, 186, p. 786–93. 2010.
- AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; TSAI, S.M; PARK, Y.K. Transformações enzimáticas de flavonoides. **Boletim CEPPA (Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos)**, 25:1, p. 61-76. 2007.
- ANTOUN, H. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, n.1, p. 57-67. 1998.
- ASGHAR, H. N. et al. Relationship in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v 35, p. 231-237. 2002.
- AKBAY, P., BASARAN, A.A., UNDEGER, U., BASARAN, N. In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. **Phytotherapy Research**. V.17, p.347. 2003.
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.** 57, p. 233-266. 2006.
- 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**, 36, p. 86-93. 1986.
- BALDANI V.L.D. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p.485-491, 2000.
- BALDANI, J.I.; BALDANI V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in 70 graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, 77, p. 549-579. 2005
- BASHAN Y.; DE-BASHAN L. E.. Plant **growth-promoting** In: HILLEL D., Encyclopedia of soils in the environment. 1ed, Oxford,.1, p.103-115. 2005.
- BEECHER G.R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **The Journal of Nutrition**, p. 3248 – 3254. 2003.
- BEGUM, A. A., LEIBOVITCH, S., MIGNER, P. AND ZHANG, F. Specific flavonoids induced *nod* gene expression and pre-activated *nod* genes of *Rhizobium*

leguminosarum increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. **Journal Exp. Botanic**. N.52, 1537–1543. 2001.

BHATTACHARJEE R. B., SINGH A., MUKHOPADHYAY S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological biotechnology**, 80, p. 199-209. 2008.

BRAMMER, S. P. Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell). 2000. 105 f. **Tese (Doutorado em Genética)** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2000.

BRAMMER, S. P.; BARCELLOS, A. L.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; MILACH, S. K. Bases genéticas da resistência durável à ferrugem da folha do trigo e estratégias biotecnológicas para o melhoramento no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 25, p. 5-20. 2000.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Regras para análise de sementes**. 1. ed. Brasília, MAPA, 2009.

BRUM, A. L.; MULLER, P. K. A realidade da cadeia do trigo no Brasil: o elo produtores/cooperativas. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. 46:1, p. 145-169. 2008.

BUGBEE, B. Nutrient management in recirculating hydroponic culture. **South pacific soil-less culture conference**, 2003, Nova Zelandia. Disponível em: <http://www.usu.edu/cpl/research_hydroponics3.htm>. Acesso em: 08 fevereiro 2016.

CAZETTA, D. A.; FORNASIERI FILHO, D.; ARF, O. Resposta de cultivares de trigo e triticales ao nitrogênio no sistema de plantio direto. **Científica**, 35, p.155-165. 2007

CHABARIBERI, REGINA DE A. O.; POZZI, ALESSANDRA C. S.; ZERAIK, MARIA LUIZA AND YARIWAKE, JANETE H.. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (*Celastraceae*) e de *Passiflora* (*Passifloraceae*) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de farmacognosia**. , vol.19, n.4 p. 860-864. 2009.

CHAMAM, A., SANGUIN H. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum* – *Oryza sativa* association. **Phytochemistry**, 87, p. 65-77. 2013.

CHAURASIA, N., WICHTL, M. Flavonol glykoside Urticadioica. **Planta Med.** 1 ed.p. 432-434. 1987.

CHUN, L.; ET. AL. Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. **Plant and Soil**, v.276, p.369-382. 2005.

COELHO, C. H. M.; Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, Vol. 37, p. 37-40. 2003.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 4 - Safra 2016/17, n. 1, p.139. Primeiro levantamento, 2016.

COODETEC. **Guia de produtos Sul, 2015**. Detalhes da cultivar. Disponível em: <<http://www.coodetec.com.br/downloads/guia-de-produtos-sul-2015.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

COOPER J. E.; Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. **Journal of applied Microbiology**.103. p.1355-1365. 2007.

COOPER, J.E. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. **Journal of Applied Microbiology**. N.41, p.1-62. 2004.

DA SILVA, A. A.; DELATORRE, C. A. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 2, p. 152-163. 2014.

DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; KENNER M. H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasiliense*. **Revista Brasileira Pesquisa Agropecuária**, 31:9,p. 645-651. 1996.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasiliense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, 36, p.284-297. 2002.

DOBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estud. av.**, São Paulo , v. 4, n. 8, p. 144-152. 1990

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**, Berlim, 28, p. 377-381. 1999.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A cultura do trigo** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/trigo1>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

EMBRAPA. Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária. Indicações técnicas da Comissão Sul brasileira de Pesquisa de Trigo e triticale. **36ª Reunião da Comissão Sul brasileira de pesquisa de trigo**. Passo fundo, RS, p.99-138. 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v.6, p.36-41. 2008.

FERRERES F., SILVA B. M., ET. AL., Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC – PAS – ESI/MS/MS: application to seeds of quince. **Phytochem. Anal.**, 14, p. 352-359. 2009.

FLAMBÓ D., Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana. Universidade Fernando Pessoa. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2013.

FORDE, B. G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, 53, p. 203-224. 2002.

FRANCIS M.S.; WOLF-WATZ, H.; FORSBERG, A. Regulation of type III secretion systems. **Curr. Opin. Microbiol.**, 5, p. 166-72. 2002.

GINDRI A. L.; Fitoquímica das cascas e do miolo da raiz de urerabaccifera (L.) Gaudich (urticaceae). **Dissertação de mestrado**. Ciências Farmacêuticas, UFSM, v.36, n.2, p. 6370. 2010.

GOBBONETO, L., LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30: 374 – 381. 2007.

GRAY, E. J., SMITH D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalin process. **Soil Biology and Biochemistry**, 37, p.395-412, 2005.

HASSAN S., MATHESIUS U. The role of flavonoids in rootrhizospheresignalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. **Journal Exp. Bot.**, v.63, p.3429-3444, 2012.

HUNGRIA M., CAMPO R. J., MENDES I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados, ISSN 1516-781X 283. Junho, 2007

HUNGRIA, M., FRANCHINI, J.C., CAMPO, R.J., GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D. & NEWTON, W., eds. **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment**. Dordrecht, Springer, p.25-42. 2005.

IBGE. Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO, **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola** - Dezembro

2016. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201612_14.shtm>. Acesso em: 19 jan. 2017.

JONES, H. D. Wheat transformation: current technology and application to grain development and composition. **Journal of cereal Science**, 41, p.137-147. 2005.

JOSHI, A. K. et al.; Stay green trait: variation, inheritance and its association with spot blotch resistance in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica**, 153:1, p. 59-71. 2007.

KENENDY I. R., et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, p. 1229-1244. 2004.

KOBAYASHI, H., NACIRI-GRAVEN, Y., BROUGHTON, W. J., PERRET, X. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Mol Microbiology**. V.51, p.335-347. 2004.

KRISHNAN, H. B., KUO, C. L., PUEPPKE, S. G. Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both nodD1 and nodD2, and is dependent on the cultivar-specificity locus, nolXBTUV. **Microbiology**, 141, p.2245-2251. 1995.

LAGE F. F. Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageiras. **Dissertação de mestrado**, Lavras: UFLA, p. 53-78. 2009.

LAKHANPAL, P., RAI, D.K. Quercetin: A Versatile Flavonoid. **Internet Journal of Medical Update**, 2:2, p. 22 – 37. 2007.

LATEIF K. A., BOGUSZ D., HOCHER V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. **Plant Signaling & Behavior**; 7:6, p. 636-641. 2012.

LEMAIRE, G.; HERBERT, Y.; CHARRIER, X. Nitrogen uptake capacities of maize and sorghum crops in different nitrogen and water supply conditions. **Agonomie**, 16, p.231-246. 1997.

LI, B. et al. Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N₂ fixation. **PNAS - Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, 113:2, p. 6496–6501. 2016.

LIN, J. Y. TANG, C. Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in select fruits and vegetables, as well as their simulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food chemistry**, 101, p.140-147. 2007.

MALAVOLTA E. **Manual de nutrição Mineral de Plantas**. São Paulo: Editora Agronomia Ceres Ltda. p.251. 2006.

MARAKHAM K. R. et al. Possible protective role of 3',4''-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. **Phytochemistry**, 49, p. 1913-1919. 1998.

MARÇO P. H., POPPI R. J., SCARMINIO I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, 31:5, p.1218-1223. 2008.

MARQUES, O.C.P. Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante. **Dissertação de Mestrado** (Área de Concentração em Farmácia). Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. p. 210. 2008.

MARSCHNER H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, p.889.1995.

MARTUSCELLO, J. A., FONSECA, D. M., NASCIMENTO JÚNIOR, D.; SANTOS, P. M., CUNHA, D. N. F. V. C., MOREIRA, L. M. Características morfogênicas e estruturais de capim-massai submetido a adubação nitrogenada e desfolhação. **Revista Brasileira Zootecnia**, 35, p.665-671. 2006.

MISHRA A., KUMAR S., PANDEY A. K. Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinosporacordifolia*. **The Scientific World Journal**, vol. 2013, p.1-16, 2013.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. Citogenética. In: Osório, E. A. (Coord.). **Trigo no Brasil**. Editora 1982. p. 95-144. 2000.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, Lavras, p.449-542. 2006.

MULLER S.D. Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá doce. **Dissertação de Mestrado**. Ciências Farmacêuticas – Universidade do Vale do Itajai – 2006.

NIJVELDT, R.J., NOOD, E.V., HOORN D.V., BOELEN P.G., NORREN, K.V., LEEUWEN P.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Journal Cli. Nutrition**, 74, p. 418 – 425. 2001.

NOVARETTI W.R.T. Coleta de amostras de raízes e solo para análise nematológica. Campinas – SP 2011 Fonte – ANNA – **Laboratório de Nematologia, Assessoria e Consultoria Agrônômica Ltda**. 2011.

OLIVEIRA F., **10ª Reunião da Comissão de Pesquisa de Trigo e Triticale**. Fórum nacional do trigo, EMATER, Londrina 27 jul. 2016.

OLIVEIRA, K. S. Influência de substratos na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* em condições de casa de vegetação. **Revista Árvore**, 36:6, p.1073-1078. 2012.

OLSTHOORN, A. F. M.; KELTJENS, W. G.; BAREN, B.; HOPMAN, M. C. G. Influence of ammonium on fine root development and rhizosphere pH of Douglas-fir seedlings in sand. **Plant and Soil**, v.133, p.75-81. 1991.

PAIM L. R. Formononetina como estimulante de micorrização em soja e milho associado à fertilizante fosfatado em latossolo. **Dissertação de mestrado em agronomia**. Universidade Federal Da Grande Dourados. 2012.

PERIN L., Estudo da comunidade bacteriana diazotrófica do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica*. Departamento de Agronomia, **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. p. 88. 2007.

PERRINE, F.M. et al. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, 58:12, p.3343-3350. 2007.

PRADO, D.Z. Enraizamento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptusurophylla* pela ação de peróxido de hidrogênio, quercetina e ácido indolbutírico. 2014.. **Dissertação de mestrado** - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, p.106. 2014.

PÜHLER, A., ARLAT, M., BECKER, A., GÖTTFFERT, M., MORRISSEY, J.P., O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? **Curr. Opin. Plant Biol.**, p. 137-147. 2004.

QIU Y., LIU Q., BETA T., Antioxidant activity of commercial wild rice and identification of flavonoid compounds in active fractions. **J. Agric. Food Chem.**, 57, p. 7543-7551. 2009.

QUISPÉL, A. A search of signals in endophytic microorganisms. **Molecular signals in Plant-Microbe Communications**. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. p. 471-491. 1992.

RODRIGUES, R. C.; MOURÃO, G. B.; VALINOTE, A. C.; HERLING, V. R. Reservas orgânicas, relação parte aérea-raiz e c-n e eliminação do meristema apical no capim-Xaraés sob doses de nitrogênio e potássio. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, p.505-514. 2007.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Review of Plant Biology**, p. 431-449. 2006.

SANDHAR, H.K., KUMAR, B., PRASHER, S., TIWARI, P., SALHAN, M., SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, p. 25 – 41. 2011.

SANTOS J. V. ET. AL.; Formononetina e fósforo não afetam a densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas na rizosfera de milho. **Enciclopédia Biosfera**. n. 21; p 1121. 2015

SANTOS, L. A., REIS V.M. **A formação do nódulo em leguminosa**. EMBRAPA AGROBIOLOGIA, p.14, ISSN1517-8498. 2008.

SCHLESINGER, W.H.; **Biogeochemistry : analysis of global change**. 3^o ed. P. 445-459. 2012

SCHRÖDER, J. J., NEETESON, J. J., OENEMA, O., STRUIK, P. C. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the state of the art. **Field Crops Research**, 66, p.151-164, 2000.

SEAB. **Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná**. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/pss.xls>>. Acesso em 14 fev. 2017.

SLEPER, D. A., POEHLMAN, J. M. **Breeding field crops**. Ames: Blackwell Pub Iowa, p. 424. 2006.

SOARES, M. O.; MARRIEL, I. E.; MAGALHÃES, P. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; CANTÃO, F. R. O.; ROCHA, M. C.; CARVALHO JÚNIOR, G. A.; MIRANDA, G. V. Discriminação de linhagens de milho quanto à utilização de nitrogênio, por meio de avaliação de características do sistema radicular. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.8, p.93-103. 2009.

SOBRINHO T.J.S.P. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, 33:2, 288-291. 2010.

SOUZA, W, P.Desenvolvimento inicial de trigo sob doses de nitrogênio em Latossolo Vermelho de Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 17:6, p.575–580. 2013.

TAPAS, A.R., SAKARKAR, D.M., KAKDE, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 7:3, p. 1089 – 1099. 2008.

TAYLOR L. P, GROTEWOLD E. Flavonoids as developmental regulators. **Curr Opin Plant Biol**, 8, p.317–23. 2005.

TEIXEIRA FILHO, M. C. M. T., BUZETTI, S., ANDREOTTI, M., ARF, O., BENETT.C. G. S. Doses, fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em trigo irrigado em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,45, p.797-804. 2010.

VAN BRUSSEL, A.A.N., RE COURT, K., PEES, E., SPAINK, H.P., TAK, T., WIJFFELMAN, C.A., KIJNE, J.W. AND LUGTENBERG, B.J.J. A biovar-specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *J Bacteriol. Journal of Applied Microbiology*. n. 172, 5394–5401.1990.

VELOSO P. A., SOUZA F. M., PIMENTA A. T. A., SILVEIRA E. R., LIMA M. A. Novos flavonoides da raiz e caule de *Platymiscium floribundum* vog.. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, Universidade Federal do Ceará, v. 23, p. 1239-1243. 2012.

VIANA, E. M.; KIEHL, J. C. Doses de nitrogênio e potássio no crescimento do trigo. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Ciência do Solo - ESALQ/LSO – Universidade de São Paulo, v.69, p.975-982. 2010.

YANO, G. T., TAKAHASHI, H. W., WATANABE, T. S. Avaliação de fontes de nitrogênio e épocas de aplicação em cobertura para o cultivo do trigo. **Ciências Agrárias**, 26, p.141-148. 2005.

ZHANG, H. M., FORDE, B. G. Regulation of arabidopsis root development by nitrate availability. **Journal of Experimental Botany**, 51:342, p. 51-59. 2000.

ZILLI J. E. ET. AL.; Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Revista brasileira de pesquisa agropecuária**. V.43, n.4, p.541-544. 2008.

ZORATO M. DE F. ET AL.; Efeitos da assepsia superficial com diferentes agentes químicos na incidência de microrganismos em sementes de soja. **Revista brasileira de sementes**. Vol. 23, n.1, p. 159-166. 2001.