

**Microbiolização de sementes com bactérias diazotróficas
isoladas de milho**

Stevan Ricardo Bordignon¹; Camila Kiritani¹; Valdionei Giassi^{1*}

¹Centro de Pesquisa Mokiti Okada, filial da Fundação Mokiti Okada, Ipeúna/SP, CEP 13537-000, Brasil.
*e-mail (autor para correspondência): valdionei.giassi@cpmo.org.br

RESUMO

O trabalho prospectou cepas de bactérias diazotróficas nativas da cultura do milho e avaliou o potencial de cada uma como rizobactéria promotora do crescimento de plantas (RPCP). Foram isoladas sete cepas e caracterizadas pela produção de ácido indolacético (AIA) e fixação biológica de nitrogênio (FBN). Dentre as cepas, AZM05 foi o maior produtor de AIA ($86,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e AZM04 o maior fixador de Nitrogênio ($41,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Após, foi realizada a microbiolização de sementes de milho com a associação da cepa AZM04 com as outras seis. As associações AZM04+AZM06, AZM04+AZM07 e AZ-Comercial apresentaram os melhores resultados na promoção do crescimento vegetal.

Palavras-chave: *Zea mays*, fixação biológica de nitrogênio, AIA, RPCP.

Seeds microbiolization with diazotroph bacteria isolated from maize

ABSTRACT

It prospected strains of corn crop natives diazotroph bacterias and evaluate its potential as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Seven strains were isolated and characterized by IAA production and biological nitrogen fixation (BNF). Among the strains, AZM05 was the greatest IAA producer ($86.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and AZM04 the higher nitrogen fixer ($41.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$). After, was performed the maize seeds microbiolization with the association of AZM04 strain with the other six. The AZM04+AZM06, AZM04+AZM07 associations and AZ-Comercial exhibited the best plant growth promotion results.

Keywords: *Zea mays*, biological nitrogen fixation, IAA, PGPR.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma gramínea cultivada e comercializada no mundo todo e alvo de massivos programas de melhoramento produtivo. Todavia, poucos desses

focam em estratégias para a eficiência na absorção de nutrientes, o que beneficiaria tanto regiões de solos pobres, quanto na redução do uso de fertilizantes (Gilbert, 2016). Se por um lado, o processo de domesticação e melhoramento proporcionou frutos e sementes maiores, por outro, negligenciou mecanismos que proporcionam a interação planta-rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. Além disso, a transição para um sistema agrícola provocou a homogeneização microbiológica do solo, impactando drasticamente em interações benéficas neste ambiente (Pérez-Jaramillo et al., 2016). Bactérias diazotróficas, como o gênero *Azospirillum*, são de vida livre e comuns na rizosfera de cereais e gramíneas, capazes de metabolizar nitrogênio de diversas fontes, executam sua fixação biológica, além de produzir auxina, influenciando na nutrição e crescimento vegetal (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000).

Competem novas pesquisas para entender melhor e aplicar a associação planta-rizobactéria. Este trabalho se propôs a prospectar cepas de bactérias diazotróficas nativas da cultura do milho, caracterizar sua capacidade direta de influenciar o crescimento das plantas e, via microbiolização, selecionar os melhores isolados para potenciais usos na agricultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Parâmetros *in vitro*

Prospecção de bactérias diazotróficas. Para a obtenção das cepas bacterianas, primeiramente, foi coletada a mucilagem de raízes adventícias de milho experimental ZMG-01 em cultivo orgânico nove semanas após o plantio no Centro de Pesquisa Mokiti Okada (CPMO), Ipeúna-SP. As bactérias diazotróficas presentes na amostra foram isolados em meio NFb e purificados a partir de plaqueamentos sucessivos (Döbereiner et al., 1995).

Produção de AIA. Inicialmente, as cepas foram cultivadas em 50 mL de meio de cultura Kasvi® Tryptic Soy Broth acrescido de 1 g.L⁻¹ de triptofano. Cada frasco recebeu 100 µL de suspensão bacteriana (1,0 x 10⁷ células.mL⁻¹) e, mantidas sob agitação a 150 rpm por 48 h à 28°C. Uma alíquota de 2 mL da cultura foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min. Posteriormente, em 1,5 mL do sobrenadante adicionou-se 1,5 mL de reagente de Salkowski (Patten e Glick, 2002). Após 20 minutos, ocorreu a leitura em

espectrofotômetro a 530 nm para a quantificação do fitormônio (Asghar et al., 2002). Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por cepa.

Fixação Biológica de Nitrogênio. As cepas isoladas foram cultivadas em tubos de ensaio 20x 70 mm, com 10 mL de meio de cultura NFb (Döbereiner et al., 1995). Cada tubo foi inoculado com 100 µL de suspensão ($1,0 \times 10^8$ células.mL⁻¹). Como controle, foi utilizado o meio de cultura sem micro-organismos. As culturas foram incubadas à 28°C por 7 dias (Kuss et al., 2007). A quantificação de nitrogênio procedeu pelo método semi-micro Kjeldahl (Malavolta et al., 1997). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por cepa.

Parâmetros *in vivo*

Microbiolização de sementes. Este experimento foi conduzido conforme metodologia adaptada de Amorim e Melo (2002). Sementes de milho Biomatrix[®] BM3061 foram desinfestadas em solução 0,7 % de hipoclorito de sódio durante 5 min e lavadas em água deionizada estéril. Após 2 horas à 25°C, as sementes foram imersas em suspensões de $1,0 \times 10^8$ células.mL⁻¹ por 15 min, compostas pela cepa isolada (AZM04) e associações, compondo os tratamentos. Após 2 horas, foi semeada uma semente por tubete (150 cm³) contendo substrato composto de solo e areia (1:1). A testemunha consistiu de sementes desinfestadas e imersas em água deionizada estéril. O controle positivo (AZ-Comercial) consistiu do uso de produto comercializado à base de *Azospirillum* ($1,0 \times 10^8$ células.mL⁻¹). Vinte dias após o plantio, o diâmetro do caule foi mensurado com paquímetro digital e as plantas foram secas a 105°C por 24h para avaliar a massa seca da raiz e da parte aérea. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com 13 repetições por tratamento.

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise da variância ANOVA, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade através do software estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas sete cepas de bactérias diazotróficas. Dos parâmetros avaliados *in vitro*, a produção de Ácido Indol-acético apresentou resultados entre 48 e 86 µg.mL⁻¹ sendo o isolado AZM05 o maior produtor (Tabela 1). As concentrações são maiores que

as apresentadas por Kuss et al. (2007). A fixação biológica de Nitrogênio ocorreu em todas as cepas e as que mostraram melhor desempenho foram AZM04 e AZM03 com 41,06 e 37,80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Valores semelhantes foram expostos por Kuss et al. (2007). Os resultados demonstram a capacidade dos isolados em promover o crescimento vegetal, pois essas características influenciam diretamente na nutrição e fisiologia da planta (Glick, 2012).

Tabela 1 – Caracterização das cepas pela produção de AIA e fixação biológica de Nitrogênio (N).

Linhagem	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	N ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
AZM05	86,08 a ¹	13,06 b ^{1,2}
AZM04	74,28 b	41,06 a
AZM01	74,24 b	29,86 a
AZM02	59,45 c	25,66 a
AZM06	58,12 c	17,26 b
AZM03	53,81 c	37,80 a
AZM07	48,03 c	17,73 b
Controle	0,17 d	9,80 b
CV (%)	9,63	18,85

¹Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ²Dados transformados ($X^{0,5}$).

A fim de avaliar a promoção do crescimento vegetal *in vivo*, foi realizada a microbiolização das sementes de milho combinando a cepa AZM04 com as outras seis cepas isoladas, no intuito de encontrar associação benéfica que pudesse favorecer o crescimento da cultura do milho. Selecionou-se a linhagem AZM04 por apresentar os melhores resultados *in vitro* na biofixação de nitrogênio e relativamente boa produção de AIA. Com os resultados obtidos (Tabela 2), verificou-se que as combinações AZM04+AZM06, AZM04+AZM07 e AZ-Comercial proporcionaram aumento significativo nos três parâmetros avaliados *in vivo*, quando comparadas ao controle. Os resultados condizem com a literatura, onde a associação com bactérias diazotróficas beneficia o crescimento vegetal (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000).

As demais combinações proporcionaram maior crescimento vegetal que o controle, embora não significativo. O fato da baixa promoção de crescimento pode ser devido a três fatores: por diferentes modos de ação das bactérias envolvidas, por competição entre as cepas, ou pela combinação entre cepas não ter sido adequada. Se existisse sinergismo entre as cepas, os resultados possivelmente teriam se mostrado mais favoráveis ao crescimento da planta, conforme cita Giassi et al. (2016).

Tabela 2 – Massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e diâmetro do caule de sementes de milho BM3061 microbiolizadas com combinações de cepas de bactérias diazotróficas.

Tratamentos	Massa Seca Parte Aérea (g)	Massa Seca Raiz (g)	Diâmetro do Caule (cm)
AZM04 + AZM06	0,2391 a ¹	0,3121 a	4,84 a
AZ-Comercial	0,2196 a	0,2658 a	4,58 a
AZM04 + AZM05	0,2063 a	0,2677 a	4,43 b
AZM04 + AZM07	0,1984 a	0,2855 a	4,66 a
AZM04 + AZM02	0,1858 b	0,2894 a	4,42 b
AZM04 + AZM01	0,1775 b	0,2971 a	4,26 b
AZM04 + AZM03	0,1769 b	0,2806 a	4,23 b
AZM04	0,1699 b	0,2573 a	4,29 b
Controle	0,1633 b	0,2776 a	4,25 b
CV (%)	26,49	16,40	10,00

¹Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

CONCLUSÕES

A cepa AZM05 foi a maior produtora de AIA (86,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e AZM04 a maior fixadora de nitrogênio (41,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As melhores combinações de cepas na promoção do crescimento de plantas de milho foram AZM04+AZM06, AZM04+AZM07 e AZ-Comercial. Trabalhos a campo são necessários para comprovar a eficiência dos mesmos.

AGRADECIMENTO

Ao Centro de Pesquisa Mokiti Okada filial da Fundação Mokiti Okada, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, E.P.R. and MELO, I.S. 2002. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 24, pp. 565-568.
- ASGHAR, H., ZAHIR, Z., ARSHAD, M. and KHALIQ, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 35, no. 4, pp. 231-237.
- DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. 1995. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB. 60p.

- FERREIRA, D.F. 2000. *Manual do Sistema SISVAR para análises estatísticas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 66 p.
- GIASSI, V., KIRITANI, C., KUPPER, K.C. 2016. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, v. 190, pp. 46-54.
- GILBERT, N. 2016. The race to create super-crops. *Nature*, vol. 533, no. 7603, pp. 308-310.
- GLICK, B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, v. 2012.
- KUSS, A.V., KUSS, V.V., LOVATO, T. and FLÔRES, M.L. 2007. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 42, pp. 1459-1465.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. and DE OLIVEIRA, S.A, 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Piracicaba: Potafos. 319 p.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 8, pp. 3795-3801.
- PÉREZ-JARAMILLO, J.E.; MENDES, R. and RAAIJMAKERS, J.M. 2016. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology*, vol. 90, no. 6, pp. 635-644.
- STEENHOUDT, O. and VANDERLEYDEN, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 24, no. 4, p. 487-506.