

Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Milho BRS Caatingueiro

Phenotypic Characterization of Endophytic Diazotrophic Bacteria Isolated from BRS Caatingueiro Maize

Tailane Ribeiro do Nascimento¹; Helanne Silva Santos Barder²; Rejane Carvalho Nascimento¹; Rita de Cássia Nunes Marinho³; Tainá Dourado Ferreira⁴; Carlos Alberto Tuão Gava⁵; Lindete Miria Vieira Martins⁶; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁷

Resumo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente as bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.), pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido. As características fenotípicas analisadas foram: tamanho, forma e cor da colônia, aparência, transparência, elasticidade, e

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), estagiária da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Bióloga, aluna do curso de pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Bom Jesus, PI.

³Bióloga, M.Sc. em Fitotecnia, UFPI, Bom Jesus, PI.

⁴Estudante de Ciências Biológicas, UPE, bolsista PIBITI-CNPq na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁵Engenheiro-agrônomo, D. Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁶Engenheira-agrônoma, D. Sc. em Ciência do Solo, professora ajunta da UNEB, Juazeiro, BA.

⁷Biólogo, D. Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

quantidade do muco. Foram caracterizadas 33 bactérias do milho. Destas, 66,7% apresentaram tamanho puntiforme e 39,4% são de bactérias maiores que 1 mm. Quanto à forma e aparência da colônia, 87,9% são de colônia circular e 60,6% são heterogêneas. Quanto à transparência, 60% apresentaram a característica opaca e as demais translúcidas. Dentre as cores observadas, 57,5% são de cores brancas; 30,3% são amarelas, enquanto 12,2% apresentaram coloração bege. Para a característica elasticidade e quantidade de muco, 60% dos isolados não apresentaram elasticidade e 78,9% dos isolados produziram pouco muco. Os isolados bacterianos do milho avaliados apresentaram elevada diversidade fenotípica e estudos complementares serão realizados para definir sua diversidade genética e seu potencial para a promoção de crescimento.

Palavra Chave: diversidade, fixação biológica de nitrogênio, inoculante.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura que apresenta grande área plantada no Brasil e, principalmente, no Nordeste, onde esta gramínea está presente em diversos pratos da culinária regional. É uma cultura muito exigente na adubação nitrogenada e o desenvolvimento de tecnologias de baixo impacto ambiental e baixo custo se faz necessário para aumentar a produtividade e reduzir os custos.

Dentre as tecnologias de baixo custo disponíveis para a cultura do milho, a inoculação com estipes de bactérias fixadoras de nitrogênio é uma prática recente no Brasil, mas com grande potencial para a adoção entre os produtores. Os dados que subsidiaram a recomendação do primeiro inoculante com bactérias diazotróficas para o milho no Brasil foram publicados em 2010 (HUNGRIA et al., 2010) e, a partir de então, a adoção da tecnologia de inoculação pelos produtores tem sido crescente.

A constante prospecção de novos isolados adaptados a diferentes regiões do Brasil é necessária para a obtenção de bactérias cada vez mais eficientes. Além das avaliações relativas à eficiência dos novos isolados, os estudos de diversidade de bactérias associativas isoladas de gramíneas podem auxiliar na melhor compreensão da diversidade de micro-organismos do solo e indicar a existência de espécies ainda não conhecidas (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013; IKEDA et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar culturalmente bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de milho cultivado no Município de Petrolina, PE.

Material e Métodos

Foram avaliadas as características culturais de 33 isolados de bactérias diazotróficas endofíticas de milho pertencente à Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido. As bactérias foram isoladas de plantas de milho BRS Caatingueiro cultivadas na área da Embrapa Produtos e Mercados, em Petrolina, PE, durante o Semiáridoshow do ano de 2013.

Amostras de raízes das plantas foram desinfestadas superficialmente e trituradas em liquidificador com solução salina (NaCl 0,85% p/v), diluídas seriadamente e inoculadas em meio de cultura BMGM semissólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). As bactérias foram purificadas e caracterizadas de acordo com suas características culturais em meio Dyg's sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986). Após o aparecimento de colônias puras, foi realizada a avaliação das características fenotípicas, sendo observados: tamanho (puntiforme, 1 mm a 2 mm ou > 2 mm), forma (circular ou irregular), cor da colônia (branca, amarela ou bege), aparência (homogênea ou heterogênea), transparência (opaca, translúcida ou transparente), elasticidade (elástica ou não elástica), e quantidade do muco (pouco ou muito muco).

Após a caracterização fenotípica dos isolados, foi construída uma matriz de caracterização binária, sendo atribuídos valores de 1 ou 0 para cada característica, possibilitando assim a construção de um dendrograma de similaridade por agrupamento com o algoritmo base no índice de Dice, utilizando o programa Past (HAMMER et al., 2001). As informações dos grupos com 100% de similaridade foram apresentadas em uma tabela para a melhor visualização das características do agrupamento (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização dos 18 grupos fenotípicos obtidos por meio do agrupamento das bactérias isolados do milho (*Zea mays* L.) (método de agrupamento UPGMA e Coeficiente de Dice).

Grupos (n° de isolados)	TC	FC	AC	TC2	CC	EM	QM
Grupo 1 (1)	P	Ci	He	Tr	Be	NN	PM
Grupo 2 (3)	P	Ci	He	Op	Be	NN	PM
Grupo 3 (2)	P	Ci	He	Op	Am	NN	PM
Grupo 4 (1)	>2	Ci	He	Op	Am	NN	PM
Grupo 5 (3)	P	Ci	Ho	Tr	Am	NN	PM
Grupo 6 (1)	P	Ci	He	Tr	Am	NN	MM
Grupo 7 (3)	P	Ci	He	Tr	Am	NN	PM
Grupo 8 (6)	P	Ci	Ho	Op	Br	NN	PM
Grupo 9 (3)	>2	Ci	Ho	Op	Br	NN	PM
Grupo 10 (1)	>2	Ir	He	Op	Br	NN	PM
Grupo 11 (2)	>2	Ci	He	Tr	Br	E	PM
Grupo 12 (2)	>2	Ci	He	Op	Br	NN	MM
Grupo 13 (1)	>2	Ir	Ho	Op	Br	NN	MM
Grupo 14 (1)	>2	Ir	He	Op	Br	NN	MM
Grupo 15 (1)	>2	Ci	Ho	Tr	Br	E	MM
Grupo 16 (1)	>2	Ir	He	Tr	Br	E	MM
Grupo 17 (1)	P	Ci	He	Tr	Br	E	PM
Grupo 18 (1)	>2	Ci	He	Tr	Br	E	PM

¹Grupo fenotípico dos isolados ²TC1 – tamanho da colônia (P: puntiforme, 1 mm a 2 mm e > 2 mm); FC – forma da colônia (Ci: circular, Ir: irregular); AP – aparência da colônia (Ho: homogênea, He: heterogênea); TC2 – transparência da colônia (Op: opaca, Tr: translúcida) CC – cor da colônia (Am: amarela, Br: branca, Be: bege); EM – Elasticidade do Muco (E: Elástico, NN: Não elástico; QM – quantidade de muco (MM: muito, PM: pouco).

Resultados e Discussão

Dentre as 33 bactérias caracterizadas, 66,7% são bactérias que apresentaram tamanho puntiforme, ou seja, menor que 1 mm e 39,4% são de bactérias maiores que 1 mm. Quanto à forma e à aparência da colônia, 87,9% são de colônias circulares e 60,6% são heterogêneas. Desta coleção de bactérias, 60% apresentaram a característica opaca no que diz respeito à transparência da colônia. Essas coleções de bactérias diferenciaram-se nas cores branca (57,5%) amarela (30,3%) e bege (12,2%). (Tabela 1).

Para a característica elasticidade e quantidade de muco, 60% dos isolados não apresentaram elasticidade e 78,9% compreendem os isolados com pouca quantidade de muco. Com base nessas características fenotípicas, as bactérias do milho foram agrupadas em um dendrograma e os isolados com 100% de similaridade, totalizaram 18 grupos distintos. Destes, o grupo que apresentou maior número de isolados foi o grupo cultural 8, compreendendo seis isolados com tamanho puntiforme, colônia circular, homogênea, opaca, pouco elástica e com pouca quantidade de muco. Esse grupo apresentou 80% de similaridade com a bactéria *Azospirillum brasilense*, estirpe BR 11001, utilizada como bactéria de referência.

A elevada diversidade fenotípica das bactérias avaliadas e a baixa similaridade destas com a estirpe de referência indicam que há bactérias diferentes das tradicionalmente isoladas utilizando esta abordagem, o que indica a presença de grupos de bactérias novas (IKEDA et al., 2013). Estudos recentes têm demonstrado que isolados diazotróficos pertencentes a espécies novas podem ser eficientes quanto à FBN e à promoção do crescimento vegetal (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013). Novos estudos avaliando os mecanismos de promoção de crescimento e a efetividade destes isolados quando inoculados em plantas de milho estão sendo conduzidos.

Conclusão

Os isolados de milho avaliados neste estudo apresentam elevada diversidade fenotípica e baixa similaridade com a estirpe de referência *Azospirillum brasilense*.

Referências

- ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 67, p. 2.790-2.798, 2001.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PEREIRA, G. M. D.; PERIN, L.; SILVA, L. M.; BARAÚNA, A. C.; ALVES, F. M.; PASSOS, S. R.; ZILLI, J. E. Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 61, p. 991-999, 2013.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, [S.l.], p. 1-9, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 10 maio 2014.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, Hague, v. 331, p. 413-425, 2010.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, p. 154-160, 2013.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J. R., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopalogica**, Botucatu, v. 12, p.16, 1986.