

Mecanismos de promoção do crescimento vegetal em bactérias não rizobianas provenientes de nódulos de *Arachis* spp.

Thaise Rosa da Silva¹; Ruth Terezinha Rodrigues²; Tailane Ribeiro do Nascimento³; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁴

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de bactérias não rizobianas, endofíticas de nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), na síntese de auxinas, solubilização de fosfato de cálcio e a presença de um fragmento do gene *nifH*. Para obter a quantificação de compostos indólicos, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante bacteriano foi adicionado em microplaca com 96 poços e sobre este 100 µL de reagente Salkowski. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Para a solubilização de fosfato de cálcio, os isolados foram inoculados em meio GL suplementado com CaCl₂ e K₂HPO₄. Os isolados foram avaliados quanto à presença do gene *nifH* pela técnica de Nested-PCR. Dentre os isolados avaliados, todos foram capazes de produzir auxinas, no entanto, apenas quatro isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio. Quanto ao gene *nifH*, todos foram considerados positivos.

Palavras-chave: bactérias endofíticas, leguminosas, gene *nifH*, inoculante.

Introdução

Diversas espécies de vegetais se associam com bactérias diazotróficas e a associação entre as plantas da família Fabaceae (Leguminosas) e os rizóbios

¹Bióloga, mestranda em Recursos Naturais do Semiárido - Univasf, bolsista Facepe, Petrolina, PE.

²Bióloga, mestranda em Recursos Naturais do Semiárido - Univasf, bolsista Cpes, Petrolina, PE.

³Bióloga, mestranda em Horticultura Irrigada - Uneb, bolsista Facepe, Juazeiro, BA

⁴Bióloga, D.Sc. em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. paulo.ivan@embrapa.br.

são os exemplos mais estudados (Dobereiner, 1990). Rizóbios são bactérias altamente especializadas capazes de se associar a leguminosas, formando estruturas radiculares ou caulinares denominadas “nódulos”. A associação entre rizóbio-leguminosa é muito importante para a agricultura porque promove aumento significativo do nitrogênio no sistema solo-planta (Costa et al., 2013). Entretanto, tem se verificado uma diversidade de bactérias não rizobianas endofíticas de nódulos radiculares, e muitos dos isolados não rizobianos obtidos nos processos de isolamento de bactérias fixadoras de N estão coabitando os nódulos com os rizóbios (Martinez-Hidalgo; Hirsch, 2017).

As bactérias não rizobianas, podem apresentar atividade significativa no interior do nódulo, atuando de forma direta, na promoção do crescimento vegetal, por meio de diversos mecanismos que devem ser investigados.

A eficiência dos inoculantes disponíveis pode ser otimizada por meio da co-inoculação dos rizóbios com bactérias não rizobianas promotoras de crescimento habitantes do ambiente nodular pela sua compatibilidade com os rizóbios e adaptação ao mesmo nicho ecológico (Dhole et al., 2016). Neste contexto, o conhecimento e a caracterização de isolados não rizobianos fornece um campo alternativo para a obtenção de microrganismos com potencial biotecnológico, uma vez que esses isolados ainda não são explorados comercialmente e podem ser uma nova estratégia para a agricultura sustentável.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados não rizobianos associados ao amendoim quanto ao seu potencial biotecnológico por meio da avaliação *in vitro* de três mecanismos de promoção do crescimento vegetal.

Material e Métodos

As 14 bactérias avaliadas neste trabalho foram obtidas e selecionadas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S RNA por Santos (2017). Estes isolados estão depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido a -80° C. Estas bactérias foram isoladas de espécies de *Arachis*, cultivadas em diferentes solos do Semiárido.

As bactérias foram reativadas em meio de cultura YM e para a quantificação de compostos indólicos foi adotada a metodologia colorimétrica proposta por (Sarwar; Kremer, 1995). A solubilização de fosfato de cálcio foi feita em placas com meio GL, de acordo com Sylvester-Bradley et al. (1982).

As bactérias foram submetidas à avaliação da capacidade em solubilizar fosfato inorgânico. Os isolados foram cultivados em meio líquido YM e alíquotas de 10 µl foram inoculadas em meio GL sólido. As placas foram incubadas por 15 dias e a capacidade de solubilização do fosfato foi avaliada por meio da formação do halo translúcido ao redor das colônias.

Os isolados foram avaliados quanto à presença do gene *nifH*, que codifica a enzima dinitrogenase redutase do complexo enzimático nitrogenase, por meio de PCR. A extração do DNA foi realizada pelo método de lise alcalina (Reis Júnior et al., 2004).

A PCR para o *nifH* amplificou um fragmento de aproximadamente 360 pb utilizando-se a abordagem de nested-PCR, sendo a primeira reação realizada com os iniciadores PolF e PolR e a segunda reação com os iniciadores NifHfor e NifHRev (Soares et al., 2006). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% a 100 V por 60 minutos e observados em transiluminador UV.

Os experimentos foram conduzidos com três repetições e os dados da avaliação da produção de auxinas foram submetidos à análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Scott-Knott ($p>0,05$) utilizando-se o programa Sisvar 5.0.

A amplificação do gene *nifH* e a solubilização de fosfatos foi avaliada qualitativamente determinando-se a presença ou ausência da característica.

Resultados e Discussão

A produção de compostos indólicos pelas bactérias isoladas do amendoim, no ensaio, apresentou valores que variaram entre 39,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 191,21 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados S6AD 24 e S6AM 2 respectivamente (Tabela 1). Os isolados considerados mais promissores foram os pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo o isolado S6AD 24, superior à referência BR 3262 e estatisticamente igual à bactéria de referência Ab-V5.

Espécies de *Bacillus* sp. têm sido apontadas, cada vez mais frequentemente, como endofíticos de nódulos, relatados em várias espécies de leguminosas (Costa et al., 2013). Os gêneros não rizobianos, como o *Bacillus*, aumentam a nodulação quando coinoculadas com um simbionte rizobiano por meio da produção de auxinas, capacidade de solubilizar fosfato, uma vez que essas substâncias atuam no crescimento radicular, fornecendo para a planta uma maior amplitude quanto à exploração do solo e, assim, atraindo um número significativo de simbiontes rizobianos, estabelecendo influência significativa no desenvolvimento e rendimento de culturas de interesse agrícola (Tariq et al., 2012).

Quanto à presença do gene *nifH*, todos os isolados amplificaram na reação de Nested-PCR. Sendo a amplificação do gene *nifH*, uma forma de seleção para isolados potencialmente diazotróficos, ou seja, fixadores de N. Avaliando a atividade significativa de não rizóbios em nódulos de amendoim, Dhole et al. (2016) também verificaram o potencial biotecnológico desses isolados a partir da amplificação do gene *nifH*, corroborando com os resultados deste trabalho.

Tabela 1. Mecanismos para a promoção do crescimento vegetal por isolados não rizobianos provenientes de nódulos de *Arachis* spp.

Isolados	Hospedeiro	Gênero	Auxinas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solubilização de CaP	nifH (direto)	nifH (nested)
S6AM30	A. magna	<i>Bacillus</i>	61,92c	-	+	+
S6AM23	A. magna	<i>Chitinophaga</i>	43,11c	-	+	+
S5AD16	A. duranensis	<i>Dyella</i>	54,78c	-	-	+
S6AD 4	A. duranensis	<i>Dyella</i>	58,35c	-	-	+
S3AB 11	A. batizocoi	<i>Leifsonia</i>	111,45b	-	-	+
S4AM 2	A. magna	<i>Paenibacillus</i>	125,97b	-	-	+
S3AB 10	A. batizocoi	<i>Paraburkholderia</i>	53,59c	+	+	+
S6AII	A. ipaensis	<i>Ralstonia</i>	88,11b	+	+	+
S2AB 5	A. batizocoi	<i>Burkholderia</i>	52,64c	+	-	+
S2AIIII	A. duranensis	<i>Bacillus</i>	50,97c	-	+	+
S6AD 24	A. duranensis	<i>Bacillus</i>	191,21a	-	-	+
S6AD 27	A. duranensis	<i>Bacillus</i>	104,30b	+	-	+
S6AM 2	A. magna	<i>Bacillus</i>	39,78c	-	+	+
S2AII	A. ipaensis	<i>Bacillus</i>	44,54c	-	-	+
BR 3262		<i>Bradyrhizobium i</i>	41,45c	-	+	+
Ab-V5		<i>Azospirillum</i>	242,64a	-	+	+

Letras minúsculas: comparação entre os isolados; letras iguais: não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p>0,05$).

Conclusão

Os isolados não rizobianos avaliados apresentam potencial para a promoção do crescimento, por meio da produção de auxinas, e capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, além da presença do gene *nifH*, com destaque para o isolado S6AD 27, de *Bacillus* sp.

Referências

- COSTA, E. M. da; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. de; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. de V. M.; MOREIRA, F. M. de S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.
- DHOLE, A.; SHELAT, H.; VYAS, R.; JHALA, Y.; BHANGE, M. Endophytic occupation of legume root nodules by *nifH*-positive non-rhizobial bacteria, and their efficacy in the groundnut (*Arachis hypogaea*). **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 1397-1407, 2016.
- DOBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 4, n. 8, jan./abr. 1990. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40141990000100011>. Acesso em: 14 ago. 2018.
- MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; HIRSCH, A. M. The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. **Phytobiomes Journal**, v. 1, p. 70-82, 2017.
- REIS JÚNIOR, F. B dos; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonenses* isolado de diferentes espécies de *Brachiaria***. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 2004. (Embrapa Cerrados. Documentos, 117).
- SANTOS, J. W. M. **Diversidade genética e potencial simbiótico de bactérias de nódulos de *Arachis* spp. em solos do Semiárido**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 282-285, 1995.
- SOARES, R. S.; ROESCH, L. F. W.; ZANATTA, G.; CAMARGO, F. A. O.; ASSAGLIA, L. M. P. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, v. 33, n. 3, p. 221-234, 2006.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.
- TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEN, T.; ALI, A. Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 84, p. 15012-15019, 2012.