



Caracterização genotípica de bactérias endofíticas do milho cultivado no Semiárido Pernambucano ⁽¹⁾

Jéssica Fernanda da Silva⁽²⁾; Thaise Rosa da Silva⁽³⁾; Tailane Ribeiro do Nascimento⁽³⁾; João Marcos Rodrigues dos Santos⁽³⁾; Ana Carla Resende Fraiz⁽⁴⁾; Paulo Ivan Fernandes-Júnior⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPq (406327/2013-0) e Embrapa (03.13.08.003.00.00).

⁽²⁾ Mestranda do Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais do Semiárido; Universidade Federal do Vale do São Francisco; Petrolina, Pernambuco; jessicafernanda.bio@gmail.com;

⁽³⁾ Graduando (a) em Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Petrolina, Pernambuco,

⁽⁴⁾ Bolsista PNPd do Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais do Semiárido; Universidade Federal do Vale do São Francisco; Petrolina, Pernambuco,

⁽⁵⁾ Pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, Pernambuco.

RESUMO:

O milho é uma gramínea com grande potencial para o cultivo em regiões semiáridas, entretanto, nestes ambientes, a sua capacidade de associação com bactérias potencialmente fixadoras de N ainda não foi avaliada. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar genotipicamente bactérias endofíticas de milho por meio da amplificação de um fragmento do gene *nifH*. O milho foi cultivado com e sem adubação nitrogenada foi coletado e a partir da raiz e colmo das plantas foram isolados os micro-organismos utilizando os meios de cultura semissólidos JMV, LGI, LGI-P e NFB como método de pré-seleção. O DNA dos isolados foi extraído com kit comercial e o gene *nifH* amplificado por PCR, considerando positivos os isolados que apresentaram o amplicom com tamanho esperado (360 pb). Foram pré-selecionadas 30 bactérias pela formação de película microaerotáxica nos meios semissólidos JMV, NFB e LGI das quais 28 foram selecionadas como positivas para a amplificação do gene *nifH*. A maioria dos isolados positivos foi proveniente da raiz do milho cultivado com adubação nitrogenada.

Termos de indexação: micro-organismos, bactérias diazotróficas, gramíneas, inoculante.

INTRODUÇÃO

Atualmente a grande maioria de cultivos agrícolas é dependente da utilização de fertilizantes químicos sintetizados, os quais proporcionam nutrientes essenciais para as plantas e otimizam os processos produtivos. Porém o uso indiscriminado desses produtos pode ocasionar a contaminação de solo e corpos d'água, além dos altos custos de produção e impacto negativo na saúde animal e humana (Bergamaschi et al., 2007; Clavijo et al., 2012). O milho é uma cultura bem adaptada a estresses abióticos com diversos mecanismos envolvidos na superação das limitações de cultivo no Semiárido, favorecendo a agricultura familiar na

região (Yadav et al., 2010; Vadez et al., 2012). Dentre os possíveis mecanismos de adaptação de plantas destaca-se a associação benéfica com bactérias diazotróficas que promovem o crescimento vegetal, suprindo a demanda de N₂ necessária à planta pelo processo de fixação biológica do N₂. Apesar deste potencial, a presença e eficiência de bactérias fixadoras de N no milho ainda é pouco esclarecida (Babalola, 2010). O presente trabalho teve como objetivo isolar bactérias endofíticas associadas ao milho cultivado com e sem adubação nitrogenada, caracterizá-las genotipicamente quanto à amplificação de um fragmento do gene *nifH*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta e amostragem

O milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) variedade BRS 150 foi cultivado sob irrigação por gotejamento no campo experimental de Bebedouro nas dependências da Embrapa Semiárido em Petrolina, PE. O tratamento aplicado no campo para as plantas de milho consistiu na ausência da adubação nitrogenada ou na aplicação de uma dose equivalente a 100 kg de N ha⁻¹ na forma de ureia. Aos 45 dias após o plantio as plantas foram coletadas em triplicata nos dois tratamentos e transportadas ao laboratório de Microbiologia do solo da Embrapa Semiárido, separando-se raiz e parte aérea para o isolamento dos micro-organismos.

Isolamento de bactérias endofíticas

Para o isolamento de micro-organismos endofíticos seguiu-se a metodologia preconizada por Döbereiner et al. (1995). O colmo e a raiz foram desinfestados superficialmente com solução de NaClO (2% v/v) e o excesso do agente sanitizante removido em água destilada estéril abundantemente. Uma alíquota de 10 g de cada amostra de raiz ou colmos foi triturada separadamente em liquidificador

comum com 90mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v). Aliquotas de 0,1 mL das soluções foram diluídas seriadamente em solução salina e inoculadas em meio semissólidos semisseletivos NFb, JMV, LGI e LGI-P (Döbereiner et al., 1995). Após incubação avaliou-se a formação de película microaerotáxica característica. As diluições com formação de película tiveram essa característica confirmada após reinoculação no meio semissólido. Após a confirmação, as bactérias foram purificadas em meio sólido original. Após a obtenção das culturas puras, a capacidade de formação de película dos isolados foi confirmada em meio semissólido. As bactérias que confirmaram esta característica fenotípica foram selecionadas para as etapas posteriores.

Caracterização genotípica

As bactérias pré-selecionadas foram crescidas em meio líquido e o DNA genômico foi extraído com Kit comercial (Axygen) e armazenado a - 20°C.

Para confirmação do potencial dos isolados para a fixação biológica de N um fragmento do gene *nifH* foi amplificado por PCR utilizando-se os iniciadores PolF (TGCGAYCCSAARGCBACTC) e PolR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) (Poly et al., 2001), visando a obtenção de um amplicom com aproximadamente 360 pb. As condições da reação consistiram em um ciclo de desnaturação inicial (5 minutos a 94°C); 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), anelamento (45 segundos a 55°C); extensão (1 minuto a 72 °C); um ciclo de extensão final (10 minutos a 72°C); 4°C final em termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Biotium) e submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (p/v) e observados em transiluminador UV (Figura 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 30 bactérias isoladas foram consideradas positivas pela formação de película microaerotáxica nos meios de cultura nos meios semissólidos LGI, JMV e NFb, não sendo confirmado nenhum isolado no meio LGI-P. O meio de cultura semissólido permite isolar micro-organismos potencialmente diazotróficos por propiciar um ambiente onde as bactérias endofíticas possam crescer e fixar N₂ por meio da, limitação da presença de O₂, preservando o complexo nitrogenase, assim como ocorre nos nódulos de plantas leguminosas e em gramíneas que são colonizadas de forma endofítica sendo esse método responsável pelo avanço dos estudos de FBN em não leguminosas (Kuss et al., 2007).

Em relação a distribuição das bactérias diazotróficas 33% foram isoladas no meio LGI, 37% em NFb e 30% em JMV sendo destacada a variação entre os tecidos vegetais de origem das bactérias. O metabolismo das diferentes fontes de carbono nos meios de cultura é um mecanismo de pré-seleção de bactérias podendo assim estimar as características das culturas e os grupos isolados em comparação com padrões de bactérias diazotróficas já descritas (Videira et al., 2007). São comuns relatos de isolamento de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em associação com gramíneas forrageiras como *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* isolados com o meio semissólido NFb, assim como o isolamento de *Azospirillum amazonense* utilizando-se o meio LGI (Döbereiner, 1995).

Comparando-se os diferentes tecidos vegetais e o suprimento nitrogenado fornecido para as plantas, observa-se que a maioria dos isolados endofíticos foi proveniente da raiz do milho cultivado sem adubação nitrogenada (TABELA 1), o que sugere a maior efetividade das bactérias para suprir, mesmo que parcialmente, a demanda de N da cultura em solo com deficiência de N. (Sarathambal et al., 2015).

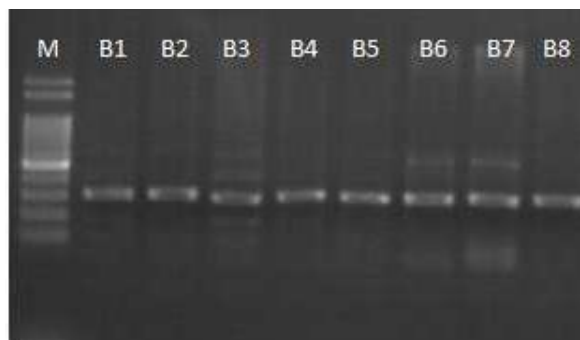


FIGURA I. Amplificação do gene *nifH* dos isolados bacterianos (1,2,3,4,5,6,7e 8, M= marcador 1Kb DNA Ladder).

Do total de 30 bactérias diazotróficas pré-selecionadas no isolamento, 28 foram consideradas positivas para amplificação de um fragmento do gene *nifH* (Tabela 1). Este gene é responsável por codificar uma subunidade da enzima dinitrogenase do complexo enzimático nitrogenase, reforçando o potencial desses micro-organismos em serem fixadores biológicos de nitrogênio. Indicando o milho como uma cultura bem favorecida pela associação benéfica com bactérias que podem contribuir para formulação de produtos biotecnológicos, beneficiando a adaptação de culturas a ambientes restritos e principalmente na

diminuição da utilização de fertilizantes químicos (Babalola, 2010; Gupta, 2013).

TABELA 1-Numero de isolados formadores de película e com resultado positivo para a amplificação de um fragmento do gene *nifH*

Tratame nto	NFB	LGI	JMV	Total	<i>nifH</i> +
C+N	3	2	0	5	4
R+N	2	2	1	5	4
C-N	0	1	3	4	4
R-N	6	5	5	16	16
Total	11	10	9	30	28

CONCLUSÕES

O milheto cultivado em solos do semiárido Pernambucano é colonizado endofiticamente por bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio, que habitam principalmente as raízes de plantas não adubadas com fertilizante nitrogenado.

AGRADECIMENTOS

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)- Semiárido e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

BERGAMASCHI, C. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, 37:727-733, 2007.

CLAVIJO, C. et al. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "Olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 11:89-102, 2012.

VADEZ, V. et al. Phenotyping pearl millet for adaptation to drought. *Frontiers in Physiology*, 3: 1-12, 2012.

YADAV, R. et al. Using genetic mapping and genomics approaches in understanding and improving drought tolerance in pearl millet. *Journal of Experimental Botany*, 62:397-408, 2010.

BABALOLA, O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32:1559-1570, 2010.

KUSS, A. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42:1459-1465, 2007.

GUPTA, G. et al. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic

bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. *Applied Soil Ecology*, 64:252-261, 2013.

SARATHAMBAL, C. et al. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. *Applied Soil Ecology*, 87:1-10, 2015.

VIDEIRA, S.S. et al. metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não leguminosas. Documento 234, Rio de Janeiro. Soropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74p.

DÖBEREINER, J. et al. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60 p.