



## Caracterização genotípica e fenotípica de bactérias associativas em um vertissolo do semiárido baiano <sup>(1)</sup>.

**Maria Idaline Pessoa Cavalcanti<sup>(2)</sup>; Indra Elena Costa Escobar<sup>(3)</sup>; Tailane Ribeiro do Nascimento<sup>(4)</sup>; Rejane de Carvalho Nascimento<sup>(5)</sup>; Katherine Gomes Oliveira<sup>(6)</sup>; Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>(7)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do Capes, CNPq e Embrapa.

<sup>(2)</sup> Estudante de mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias, UEPB, Paraíba, PB idalinepessoa@hotmail.com<sup>(3)</sup> Bolsista do PNPd no Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco. <sup>(4,5,6)</sup> Estudante de Graduação em Ciências Biológicas, UPE, Petrolina, PE. <sup>(7)</sup> Pesquisador, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Semiárido.

**RESUMO:** A cultura do milho é colonizada por bactérias diazotróficas endofíticas, as quais podem promover o crescimento das plantas através da fixação biológica de nitrogênio, sendo importantes principalmente em áreas com baixa disponibilidade deste nutriente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de milho em solo do Semiárido, através da caracterização fenotípica e genotípica. A caracterização fenotípica foi realizada através da caracterização morfológica cultural em meio Dyg's sólido. A caracterização genotípica foi avaliada através da análise nifH e o nested de 33 bactérias diazotróficas isoladas de duas cultivares de milho (BRS Gorotuba e BRS Caatingueiro) cultivadas em um vertissolo do semiárido baiano.

**Termos de indexação:** fixação biológica do nitrogênio, diversidade.

### INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea Mays*) é amplamente difundida no Brasil, principalmente no Nordeste, sendo uma alternativa de grande valor econômico para os pequenos e médios agricultores em virtude do preço de mercado e da demanda pelo produto in natura (MAPA 2010). Essas plantas destacam-se por sua capacidade de se associarem com bactérias diazotróficas capazes de fixar nitrogênio atmosférico, essas bactérias são encontradas no interior das raízes e colmos, e também podem ser encontradas no solo rizosférico (HUNGRIA et al., 2010). Vários estudos já constatarem o potencial de utilização de bactérias diazotróficas como promotoras de crescimento de plantas (SALA et al. 2008; SILVA et al. 2006), sendo uma alternativa na diminuição dos custos de produção e diminuição no uso de fertilizantes nitrogenados, refletindo em ganhos para o meio ambiente. Além disso, a utilização de variedades precoces de milho, associada a

tecnologias sustentáveis, como o uso de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio, constitui um dos métodos mais promissores para o aumento da produtividade do milho com baixo custo (Reis et al., 2009; Hungria, 2011).

O conhecimento da biodiversidade presente no solo, assim como a identificação das bactérias diazotróficas endofíticas, tem como finalidade selecionar estirpes eficientes e mais adaptadas às condições ambientais das diferentes regiões, explorando de forma mais eficiente o potencial biotecnológico desses micro-organismos associados ao milho. Um grande número de bactérias diazotróficas pode colonizar a planta do milho, no entanto, a diversidade de espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio que apresentem relações simbióticas com essa planta, ainda não é bem conhecida (ROESCH, 2007).

A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas é uma ferramenta útil para o conhecimento da diversidade microbiana e tem como principal vantagem o uso de métodos moleculares que em uma única reação permite a detecção de polimorfismo para a caracterização molecular dos isolados (CHUEIRE et al., 2000b). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica e genotípica de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de milho em solos do Semiárido.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Obtenção dos isolados

As bactérias foram isoladas de solo e rizosférico e de plantas de milho variedades BRS Caatingueiro e BRS Gorotuba cultivadas no Campo Experimental de Mandacaru- BA durante o mês de Janeiro à Março de 2015. O experimento em campo foi conduzido utilizando duas doses de N (zero ou 90 kg de N.ha<sup>-1</sup>-dose recomendada para a cultura na região), quinze dias após o plantio. Estes dois tratamentos de N foram utilizados para avaliar a influência da aplicação de N da diversidade de bactérias



diazotróficas associadas ao milho.

Amostras de solo rizosférico, raiz e colmo foram coletadas após 45 dias de plantio. As amostras de raiz e colmo foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1% durante 10 minutos e lavadas com água destilada estéril. O material triturado em solução salina e diluído de forma seriada até  $10^{-6}$ . As diluições foram inoculadas em meio de cultura BMGM semi-sólido. (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) As bactérias que formaram a películas foram purificadas e caracterizadas em meio de cultura DYGS sólido (Rodrigues Neto et al., 1986) até a obtenção de culturas puras.

#### Caracterização Fenotípica

Para caracterização fenotípica foram analisados: o tamanho das colônias (<1; 1-2; >2), a forma (circular ou irregular), a cor (creme, amarela, laranja e marrom), a transparência (translúcida ou opaca), a elevação, a presença e a quantidade de muco (pouco ou muito). Após a caracterização fenotípica dos isolados, foi construído 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 base no índice de Bray-Curtis, utilizando o programa PRIMER 6.

#### Extração do DNA genômico e amplificação do gene *nifH*

Para a extração do DNA, as bactérias foram cultivadas em meio Dyg's líquido por 48h. O caldo de cultivo foi centrifugado (6000 g/5 min) e lavado por duas vezes com água destilada autoclavada. O precipitado foi submetido a sucessivos períodos de choque térmico para o rompimento da membrana e extração do DNA bacteriano (Fernandes Júnior et al., 2013). Os isolados obtidos foram avaliados quanto à amplificação de um fragmento do gene *nifH* utilizando o par de iniciadores universais PolF e PolR (Poly et al., 2001) Os produtos das PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (p/v) e visualizados em sistema de fotodocumentação com luz UV. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram um dos fragmentos com o tamanho molecular desejado (360 pb para o *nifH*). Duas bactérias diazotróficas foram incluídas como referências, a BR3262 e a BR3269.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o procedimento de isolamento e purificação, foram obtidos 33 isolados bacterianos dos quais 15% apresentaram tamanho maior que 2mm, 45% menor que 1mm e 39% entre 1 a 2mm. No que diz respeito a forma, 90% apresentam forma circular. Quanto ao aspecto da

colônia 100% foram homogêneas. Para a característica cor da colônia, foram considerados 63% para a cor creme, 18% laranja, 15% amarela e 3 % marrom. Quanto a outras características 45% apresentaram elevação e 51% apresentaram muco, sendo que 30% com pouco e 21% muito muco.

O agrupamento dos isolados no dendrograma de similaridade, de acordo com suas características culturais, formou 20 grupos com mais de 80% de similaridade, dos quais 15 são formados por apenas um indivíduo (Tabela 1).

Os grupos 8 e 20 apresentaram a maior quantidade de indivíduos, com 5 e 6 isolados, respectivamente. As principais características destes grupos foram, quanto ao tamanho, a forma, cor, presença e ausência de muco. O grupo cultural 8 apresentou tamanho <1mm, ausência de muco e cor creme. Enquanto que o grupo 20, tamanho entre 1-2 mm, presença de muco e grande quantidade do mesmo e cor laranja. Para as características aparência e forma os dois grupos foram homogêneos apresentando formato circulares e formações transparentes.

Novos estudos estão sendo conduzidos com os representantes de cada grupo genotípico para verificar sua capacidade em promover o crescimento vegetal em plantas de milho.

**Tabela 1.** Caracterização fenotípica de bactérias isolados de milho

Grupos/ Nº de isolados	Características dos grupos							
	TC	FC	AC	TR	CC	E	PM	QM
Grupo 1 (1)	>2	I	Hom	O	Cr	N	N	N
Grupo 2 (1)	<1	C	Hom	T	Cr	S	N	N
Grupo 3 (1)	1-2	C	Hom	T	Cr	S	N	N
Grupo 4 (1)	1-2	C	Hom	O	Cr	N	N	N
Grupo 5 (2)	<1	C	Hom	O	Cr	N	N	N
Grupo 6 (2)	>2	C	Hom	T	Cr	N	N	N
Grupo 7 (1)	<1	C	Hom	T	Am	N	N	N
Grupo 8(5)	<1	C	Hom	T	Cr	N	N	N
Grupo 9 (3)	<1	C	Hom	T	Cr	N	S	P
Grupo 10 (1)	<1	I	Hom	T	Cr	N	S	P
Grupo 11 (1)	1-2	I	Hom	T	Cr	N	S	P
Grupo 12 (1)	1-2	C	Hom	T	Mar	N	S	P
Grupo 13 (1)	<1	C	Hom	T	Am	N	N	N
Grupo 14 (1)	<1	C	Hom	T	Am	N	S	P
Grupo 15(1)	1-2	C	Hom	T	Am	N	S	P



Grupo16 (1)	>2	C	Hom	T	Am	S	S	P	RÓDRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e
Grupo 17(1)	1-2	C	Hom	T	Cr	S	S	P	cultivo de <i>Xantomonas campestris</i> pv. citri tipo B.
Grupo 18(1)	>2	C	Hom	T	Cr	S	S	M	Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 12, p. 16, 1986.
Grupo 19(1)	1-2	C	Hom	T	Cr	N	N	N	ROESCH, L. F. W. Diversidade de bactérias
Grupo 20 (6)	1-2	C	Hom	T	Lar	S	S	M	diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul. 2007. 143f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

Tamanho do isolado: <1;>2; 1-2.Cr: creme lar: laranja Am: amarelo Mar: Marron. Forma da Colônia: C:circular I:irregular aparência da colônia: Hom: homogênea Het: heterogênea Transparência: T: translúcida O:opaca Elevação: S: sim N: não Presença de muco: S: sim N: não Quantidade de Muco: M: muito P: pouco N:nenhum

### CONCLUSÕES

Plantas de milho apresentam alta diversidade de bactérias associadas podendo ser consideradas para estudos futuros onde os isolados sejam avaliados como potenciais promotores de crescimento.

### REFERÊNCIAS

CHUEIRE, L. M. O. et al; NISHI, C. Y. M., LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de Bradyrhizobium Rhizobium utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com "primers" aleatórios ou específicos. Agricultura Tropical, v. 4, n. 1, p. 80-95, 2000.

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, v.67, p.2790-2798, 2001.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. Duplex PCR para a Amplificação Simultânea de Fragmentos dos Genes nifH e nodC em Bactérias Isoladas de Nódulos de Leguminosas. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158).

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Documentos 325).

POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, F. & MONROZIER, L.J. Comparison of nifH gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. Appl. Environ. Microbiol., 67:2255-2262, 2001.

REIS, V. M. ; ALVES, G.C.; MARRIEL, I.E.; REIS JUNIOR, F.B.; ZILLI, J.E. Recomendação do inoculante para cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR 11417. Seropedica: Embrapa Agrobiologia, 2009 (Comunicado Técnico).

SALA, V. M. R.; CARDOSOS E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 2008.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. de S. F. da; FIGUEIREDO, M. do V. B. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp). Acta Scientiarum – Agronomy, Maringá, v. 28, n. 3, p. 407-412, 2006