

# Avaliação de Dois Mecanismos de Promoção do Crescimento Vegetal in vitro por Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho

Survey of Two in vitro Plant Growth  
Promotion Mechanisms Presented  
by Diazotrophic Endophytic Bacteria  
from Maize

---

*Tailane Ribeiro do Nascimento<sup>1</sup>; Rejane de Carvalho Nascimento<sup>1</sup>; Katherine Gomes Oliveira<sup>2</sup>; Maria Idaline Pessoa Cavalcanti<sup>3</sup>; Indra Elena Costa Escobar<sup>4</sup>; Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>5</sup>*

## Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de bactérias diazotróficas endofíticas de milho na síntese de ácido indolacético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio in vitro. Foram avaliadas 44 bactérias. Estes isolados foram inoculados em meio Dygs líquido com triptofano, em triplicata, e incubadas sob agitação constante (100 rpm) durante sete dias. Após esse período, avaliou-se a densidade ótica (DO) das culturas (540 nm), ajustando-se a concentração das culturas para 0,5. Após o ajuste da DO, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas durante 3 min a 10.000 rpm. Cem microlitros de reagente de Salkowski foram adicionados a 150  $\mu$ L do sobrenadante e incubados no escuro

---

<sup>1</sup>Graduação em Ciências Biológicas, UPE, Petrolina, PE. Estagiária da Embrapa Semiárido

<sup>2</sup>Graduação em Ciências Biológicas, UPE, Petrolina, PE. Bolsista PIBIC/CNPq da Embrapa Semiárido

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, Mestranda em Ciências Agrária, UEPB, Campina Grande, PB.

<sup>4</sup>Bióloga, D.Sc em Biologia de Fungos. Bolsista PNPd, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Univasf, Petrolina, PE

<sup>5</sup>Biólogo, D.Sc em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. paulo.ivan@embrapa.br

durante 30 minutos e lidos a 530 nm. Para a solubilização de fosfato de cálcio, os isolados foram crescidos em meio GL suplementado com  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Dentre as bactérias avaliadas, 13 apresentaram produção de AIA em meio líquido superior ao apresentado pela estirpe de referência. Todos os isolados cresceram no meio GL, no entanto, nenhum isolado foi capaz de solubilizar o fosfato de cálcio. Bactérias endofíticas diazotróficas presentes no milho apresentam potencial para a promoção do crescimento vegetal por meio da produção de produção do ácido indolacético.

**Palavra-chave:** Milho, AIA, Solubilização de Fosfato.

## Introdução

Atualmente, várias pesquisas vêm sendo conduzidas com a finalidade de encontrar fontes que disponibilizem nutrientes de modo alternativo aos fertilizantes agrícolas (TAIZ; ZIEGER, 2004; GUIMARÃES et al., 2007). Nesse sentido, as bactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e, ou promotoras de crescimento vegetal têm sido um dos principais objetos de estudo.

Alguns estudos têm encontrado respostas positivas na produção de AIA, hormônio promotor de crescimento produzido por bactérias endofíticas diazotróficas (SILVA et al., 2013). Além da produção de hormônios promotores de crescimento, essas bactérias podem auxiliar na disponibilização do fósforo para as plantas, solubilizando nutrientes insolúveis no solo, como o fósforo, por exemplo.

O milho (*Zea mays*) é a gramínea mais cultivada no mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor desta cultura (BRASIL, 2015). Esse grão se destaca pela sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), por meio de bactérias diazotróficas encontradas no interior das raízes e colmos da planta e que contribuem para redução do uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 2010). No Submédio do Vale do São Francisco, o milho 'BRS Caatingueiro' pode ser colonizado por uma grande variedade de bactérias endofíticas (NASCIMENTO et al., 2014), no entanto, o potencial destes isolados como promotores de crescimento vegetal ainda é desconhecido. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho na síntese de ácido indolacético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio.

## Material e Métodos

Foram avaliadas 27 bactérias depositadas na coleção de culturas de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido. Estes isolados foram isolados do milho 'BRS Caatingueiro' cultivado no Campo Experimental da Embrapa Produtos e Mercados em Petrolina, PE durante a feira Semiárido Show de 2013 (NASCIMENTO et al., 2014).

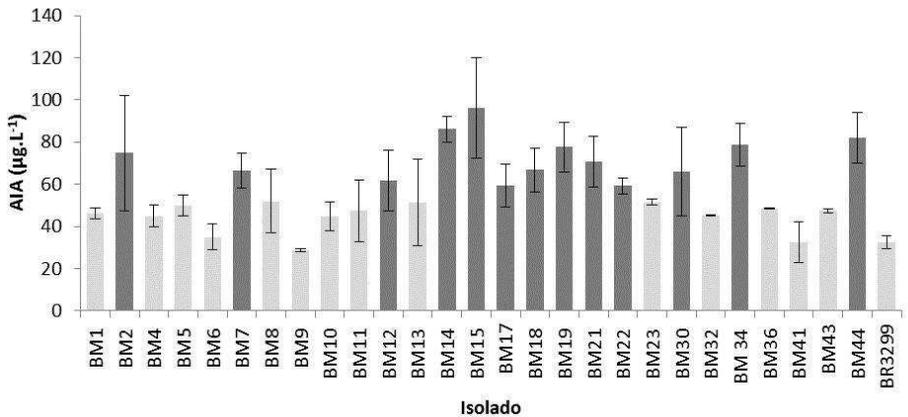
As culturas foram avaliadas quanto à capacidade de produzir AIA e de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*. Cada bactéria foi inoculada, a partir de uma colônia isolada, em 5 mL de meio líquido Dygs, e incubada sob agitação durante 48 horas, para a produção de um pré-inóculo. Alíquotas de 1 mL do pré-inóculo foram repicadas em meio líquido Dygs suplementado com triptofano, em triplicata, e incubadas sob agitação constante (100 rpm) durante sete dias. Após esse período, avaliou-se a densidade ótica (DO) das culturas (540 nm), ajustando-se a concentração para 0,5. Após o ajuste da DO, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas durante 3 min a 10.000 rpm. Cem microlitros de reagente de Salkowski (2% de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M em 35% de ácido perclórico) foram adicionados a 150  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e incubados no escuro durante 30 minutos e lidos em espectrofotômetro a 530 nm. Para a estimativa da produção de AIA, foi utilizada uma curva padrão, previamente obtida, com concentrações conhecidas de AIA sintético: 0, 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat.

A avaliação da capacidade das bactérias em solubilizar fosfato inorgânico, *in vitro*, foi realizada segundo metodologia descrita por Sylvester-Bradley et al. (1982). As bactérias foram repicadas, a partir de um pré-inóculo. Para isso, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram repicadas em triplicata em meio GL sólido contendo: glicose 10  $\text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  e ágar 15  $\text{g.L}^{-1}$ . Antes da distribuição em placas, foram adicionados ao meio 100  $\text{mL.L}^{-1}$  de cloreto de cálcio (10%) e 50  $\text{mL.L}^{-1}$  de fosfato de sódio bibásico (10%). O crescimento das colônias e, ou a formação de halo foram avaliados cinco dias após a inoculação.

## Resultados e Discussão

Dentre as 27 bactérias estudadas, todas foram capazes de sintetizar AIA utilizando o triptofano como precursor em alguma quantidade,

sendo que 13 delas foram capazes de produzir quantidades de AIA superiores ao produzido pela estirpe de referência (BR 3299 de *Microvirga vignae*) (Figura 1). Bactérias isoladas de gramíneas apresentam a capacidade de produzir AIA em quantidades variáveis a depender das espécies e das estirpes estudadas (KUSS et al., 2007; SILVA et al., 2013). A correlação positiva entre a produção de AIA in vitro e a efetividade na promoção do crescimento vegetal já foi demonstrada (COSTA et al., 2013), indicando o potencial das bactérias isoladas do milho avaliadas neste estudo.



**Figura 1.** Produção de ácido indolacético (AIA) in vitro por isolados diazotróficos endofíticos de milho. Colunas da mesma cor não diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ( $p < 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média.

Apesar de haver isolados potencial para a produção de AIA como mecanismo de promoção do crescimento vegetal, nenhuma das bactérias avaliadas apresentou a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio in vitro, apesar de terem sido capazes de crescer no meio GL com fosfato de cálcio. Muitas bactérias endofíticas apresentam capacidade diferenciada para a promoção do crescimento vegetal, com um ou mais mecanismos. Os resultados deste estudo indicam que apesar de as bactérias avaliadas não apresentarem capacidade de solubilizar fosfato in vitro, as mesmas apresentam outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal. Para determinar o potencial de inoculação destes isolados, avaliações de outros mecanismos de promoção do crescimento, bem como experimentos de inoculação podem ser conduzidos.

## Conclusão

Bactérias endofíticas diazotróficas presentes no milho apresentam potencial de produção de AIA como mecanismo de promoção do crescimento, no entanto, os isolados obtidos não apresentam capacidade de solubilizar o fosfato de cálcio.

## Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Milho**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho> > . Acesso: 28 abr. 2015.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 48. p. 1275-1284. 2013.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; JACOB NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, p. 393-398, 2007.

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.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLORES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, p. 1459-1465, 2007.

NASCIMENTO, T. R.; BARDEN, H. S. S.; NASCIMENTO, R. C.; MARINHO, R. C. N.; FERREIRA, T. S. D.; GAVA, C. A. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JUNIOR, P. I. Caracterização fenotípica de bactérias diazotróficas isoladas de milho BRS Caatingueiro. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 9., 2014, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2014. p. 183-188. (Embrapa Semiárido. Documentos, 261).

SILVA, M. C. P.; FIGUEIREDO, A. F.; ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 29, p. 163-171, 2013.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Quantitative survey of phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of grasses and legumes in the Amazon. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, p. 15-22, 1982.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.