

Caracterização de Rizóbios Endofíticos de Milho por Meio da Amplificação de Genes Simbióticos e Produção de Compostos Indólicos in vitro

Characterization of Endophytic Rhizobia from Maize by Symbiotic Genes Amplification and in vitro Production of Indolic Compounds

Tailane Ribeiro do Nascimento¹, Thaise Rosa da Silva², Katherine Gomes de Oliveira², Maria Idaline Pessoa Cavalcanti³, Ana Carla Resende Fraiz⁴, Paulo Ivan Fernandes Júnior⁵

Resumo

Objetivou-se caracterizar uma coleção de rizóbios endofíticos do milho por meio da amplificação de genes simbióticos e produção de compostos indólicos. A amplificação dos genes simbióticos foi feita por meio de reações de duplex-PCR para os genes *nodC* e *nifH*. A caracterização bioquímica foi realizada pela quantificação de compostos auxínicos produzidos em meio suplementado com triptofano. Dos 102 isolados avaliados, 89 foram positivos para a amplificação dos genes *nifH* e *nodC*. Destas bactérias, 78 bactérias

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), bolsista PIBIC-Facepe/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

² Estudante de Ciências Biológicas, UPE, bolsista Pibit-CNPq/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³ Engenheira-agrônoma, M.Sc. em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB.

⁴ Bióloga, D.Sc. em Fisiologia Vegetal, bolsista PNPd/Capes, Universidade do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina, PE.

⁵ Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

foram caracterizadas como produtoras de auxinas, com destaque para os isolados LMC16 e LMG27 que se destacaram das demais bactérias.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, promoção de crescimento, inoculante.

Introdução

As bactérias promotoras de crescimento são aquelas que se associam a diversas espécies vegetais e contribuem para crescimento e desenvolvimento de plantas de interesse econômico (ESTRADA et al., 2013). Estes micro-organismos apresentam diversos mecanismos de ação como, por exemplo, fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal, tais como auxinas, giberelinas e citocininas.

A FBN é realizada por bactérias diazotróficas que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, capaz de catalisar a redução do nitrogênio atmosférico (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013). Os reguladores de crescimento vegetal da classe das auxinas, produzidos no meristema apical das plantas, têm a função de promover o crescimento de raízes e caules através do alongamento celular (CENTELLAS et al., 1999). Este fitormônio pode ter sua produção realizada também por bactérias associativas, por isso é importante avaliar a capacidade microbiana em produzir este regulador. Muitas bactérias diazotróficas são capazes de auxiliar no crescimento vegetal por meio de outros mecanismos além da FBN, como a produção de compostos indólicos, por exemplo.

Diversas bactérias podem se associar a espécies vegetais e nos últimos anos estirpes de rizóbio têm sido obtidas e caracterizadas. Rouws et al. (2014) propuseram a abordagem de se inocular extratos vegetais oriundos de gramíneas em leguminosas como plantas-isca para a obtenção de rizóbios. Utilizando a mesma abordagem, Cavalcanti (2016) isolou uma grande diversidade de rizóbios oriundos de extratos de raízes e colmos de milho (*Zea mays* L.) cultivado na região semiárida, utilizando o feijão-caupi como planta-isca.

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização dos isolados rizobianos com a abordagem molecular e bioquímica por meio da amplificação dos genes *nifH* e *nodC* em uma reação de duplex-PCR

Material e Métodos

Neste trabalho foram avaliadas 102 bactérias diazotróficas isoladas de plantas de milho das variedades BRS Caatingueiro e BRS Gorutuba cultivadas nos Campos Experimentais de Bebedouro e Mandacaru, nas dependências da Embrapa Semiárido. Estes isolados estão depositados na Coleção de Culturas de Micro-Organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CAVALCANTI, 2016).

Para autenticação molecular dos isolados de leguminosas foi utilizado um protocolo de duplex PCR para amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nodC* e *nifH* segundo Fernandes Júnior et al. (2013). O DNA das amostras foi extraído utilizando um kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante. A realização das reações de PCR foram realizadas com o par de iniciadores PolF e PolR, para a amplificação de um fragmento do gene *nifH*, com aproximadamente 360 pb, e o par de iniciadores *nodC*For e *nodC*Rev para amplificação de um fragmento de aproximadamente 980 pb do gene *nodC*. As condições da PCR foram realizadas de acordo com Fernandes Júnior et al. (2013). Os produtos da PCR, corados com GelRed (Biotium), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) a 100 V por 120 minutos e visualizado em transluminador sob luz UV.

As bactérias selecionadas nas reações de duplex-PCR foram avaliadas quanto à capacidade de produzir compostos indólicos in vitro. Cada bactéria foi inoculada em meio YM líquido e incubada sob agitação constante por três dias para a produção de um pré-inóculo que foi novamente inoculado em meio YM líquido suplementado ou não com triptofano, e colocado sob agitação constante durante 7 dias.

Após esse período avaliou-se a densidade ótica (DO) das culturas (540 nm) em espectrofotômetro, ajustando-se sua concentração para $DO_{540} = 0,5$. Aliquotas de 1ml foram centrifugadas durante 3 minutos a 6000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado o reagente de Salkowski (2% de $FeCl_3$ 0,5 M em 35% de ácido perclórico) na proporção de 2:1. Em seguida a mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos. Após esse período, leituras a 530 nm foram procedidas em espectrofotômetro em microplacas de ELISA.

Para a estimativa da produção de AIA, utilizou-se uma curva padrão, previamente obtida, com concentrações conhecidas de AIA sintético. 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 Sisvar.

Resultados e Discussão

A escolha das bactérias do isolamento de nódulos de feijão-caupi foi feita por meio de duplex-PCR (Figura 1). Nestas reações, dos 102 isolados avaliados, 89 foram positivos para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*.

Esta abordagem metodológica permite a avaliação prévia da capacidade diazotrófica e nodulífera de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas reduzindo o número de isolados que serão testados em ensaios de autenticação em condições de casa de vegetação (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013).

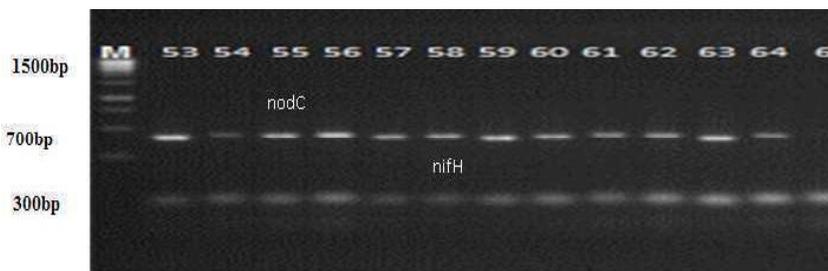


Figura 1. Amplificação de fragmentos dos genes *nifH* e/ou do gene *nodC* de isolados rizobianos no método de Duplex-PCR.

Após confirmar a amplificação no duplex procedeu-se os estudos de produção de compostos auxínicos pelas bactérias (Tabela 1). Dos 86 isolados, 11 não produziram auxina com suplementação de triptofano.

Tabela 1. Produção de compostos indólicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por bactérias diazotróficas isoladas de milho (*Zea mays* L.), na presença (C/) e ausência (S/) de L-triptofano (L-try).

Isolados	Parte da planta	Adubação	C/ L-try	S/ L-try	Isolados	Parte da planta	Adubação	C/ L-try	S/ L-try
LMC16	raiz	c/N	525,46 ^a	0b	LBG57	raiz	c/N	44,99c	42,38a
LMG27	raiz	c/N	412,64 ^a	0b	LBC80	solo	s/N	43,66c	0b
LBC62	solo	s/N	302,77b	0b	LBG65	raiz	s/N	43,44c	18,63b
LMG28	raiz	c/N	298,8b	131,73a	LBC58	raiz	c/N	43,22c	16,15b
LMG29	solo	c/N	242,64b	1,98b	LBC56	solo	c/N	42,77c	160,15a
LMG6	solo	c/N	217,26b	115,29a	LBC76	solo	s/N	42,55c	9,95b
LMC26	solo	c/N	182,36b	0b	LBC55	raiz	c/N	42,33c	73,26a
LMC24	solo	c/N	176,72c	0b	LMG37	raiz	s/N	41,87c	7,05b
LBC66	raiz	s/N	142,99c	5,63b	LBC77	solo	s/N	41,44c	17,93b
LBC63	solo	s/N	128,1c	0b	LBC64	solo	s/N	39,66c	0b
LBC70	raiz	s/N	119,22c	41,07a	LMC17	solo	c/N	39,31c	7,07b
LBC72	solo	s/N	113,44c	0b	LBC59	raiz	c/N	37,99c	0b
LBC73	solo	s/N	105,66c	25,29a	LMG34	solo	s/N	37,26c	7,98b
LBC90	solo	c/N	103,88c	22,87a	LMG31	raiz	c/N	36,23c	29,71a
LBG68	solo	s/N	94,99c	23,93a	LMG36	solo	s/N	35,72c	67,07a
LBC87	solo	c/N	83,99c	0b	LMG32	solo	s/N	34,18c	66,62a
LBC61	raiz	s/N	79,44c	19,6a	LBC81	raiz	c/N	31,66c	3,51b
LBC88	solo	c/N	78,55c	0b	LBG86	raiz	c/N	31,66c	15,04b
LMC15	solo	c/N	76,98c	29,76a	LBG83	raiz	c/N	31,33c	33,04a
LBG100	solo	c/N	70,33c	2,97b	LBG96	colmo	c/N	30,99c	6,85b
LBC60	raiz	s/N	65,66c	54,16a	LMC2	solo	s/N	30,08c	40,6a
LBG69	solo	s/N	60,32c	71,27a	LMG31	raiz	c/N	24,44c	20,15a
LBG52	solo	c/N	59,99c	1,09b	LBG98	colmo	c/N	20,16d	4,12b
LBG53	raiz	c/N	59,44c	0,86b	LMC21	solo	c/N	16,97d	13,53b
LBG93	raiz	c/N	59,22c	21,49a	LMC3	raiz	c/N	16,18d	0b
LBG95	colmo	c/N	58,66c	0b	LMG10	solo	c/N	14,13d	0b
LBG54	raiz	c/N	58,55c	4,2b	LMC19	solo	c/N	12,36d	6,4b
LMC10	raiz	c/N	55,66c	19,18b	LMC23	raiz	c/N	6,69d	151,96a
LBC89	solo	c/N	54,33c	3,98b	LMG2	raiz	c/N	5,69d	3,76b
LBG84	raiz	s/N	53,44c	5,96b	LMG33	solo	s/N	4,13d	30,18a
LBC75	solo	c/N	52,55c	40,18a	LMG5	raiz	c/N	12,33d	35,49a
LBC94	solo	c/N	52,55c	5,51b	LMC22	solo	c/N	1,31d	208,42a
LBG99	raiz	c/N	52,55c	0b	LMC4	solo	c/N	0d	16,2b
LBC85	raiz	c/N	51,66c	1,31b	LMG15	solo	c/N	0d	0b
LBG82	raiz	c/N	51,33c	13,07b	LMC26	solo	c/N	0d	0b
LBC79	raiz	s/N	50,99c	0b	LMG14	solo	c/N	0d	0b
LBC71	raiz	s/N	49,88c	0b	LMC13	colmo	c/N	0d	0b
LBC78	solo	s/N	49,44c	1,09b	LMG20	solo	c/N	0d	0b
LBC92	solo	c/N	48,33c	39,6a	LMG35	solo	s/N	0d	0b
LBC91	solo	c/N	47c	0b	LMG11	solo	c/N	0d	89,51a
LBC67	raiz	s/N	46,77c	0b	LMG7	solo	c/N	0d	0b
LBC74	solo	s/N	46,1c	55,73a	LMC18	solo	c/N	0d	0b
LBG97	solo	c/N	45,21c	30,16a	LMC8	solo	c/N	0d	0b
					Controles				
BR 3267	-	-	62,99c	55,04a					
BR 3299	-	-	53,66c	30,6a					

Os isolados que apresentaram maiores níveis de produção dos compostos indólicos foram LMC16 e LMG27. Ademais, sete isolados mostraram-se capazes de produzir compostos indólicos em taxas superiores ao observado para as duas estirpes de referência utilizadas. A suplementação de triptofano uma vez que é um dos precursores da biossíntese de ácido indol acético (PAEPEN et al., 2007). Endofiticamente, a produção de compostos indólicos pode aumentar o volume de raízes secundárias, o que favorece a absorção de água e nutrientes. Assim, a seleção de bactérias capazes de produzir elevadas quantidades de compostos indólicos pode revelar isolados com potencial para promoção de crescimento vegetal.

Conclusão

Grande parte dos isolados rizobianos foi selecionada por meio da amplificação dos genes simbióticos na abordagem de Duplex-PCR. Dentre os isolados avaliados há micro-organismos com o potencial para a promoção do crescimento vegetal por meio da produção de compostos indólicos.

Referências

- CAVALCANTI, M. I. P. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal em milho cultivado no Semiárido utilizando diferentes estratégias para o isolamento.** 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.
- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MULLER, N. T. G.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento in vitro da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 2, p 181-186, fev. 1999.
- ESTRADA, G.; BALDANI, V.L.D; OLIVEIRA, D.M; URQUIAGA, S; BALDANI, J.I Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, Hauge, v. 369, n.1/2, p. 115-129, 2013.
- 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. 6 p. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158)

PAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Bethesda , v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

ROUWS, L. F.M.; LEITE, J.; MATOS, G. F.; ZILLI, J. E.; COELHO, M. R. R.; XAVIER, G. R.; FISCHER, D.; HARTMANN, A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 6, p. 354-363, 2014.