

Caracterização Molecular e Capacidade de Promoção do Crescimento Vegetal de Bactérias Diazotróficas Isoladas do Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

*Thaise Rosa da Silva*¹; *Beatriz Rodrigues Carvalho*²; *João Marcos Rodrigues dos Santos*³; *Jéssica Fernanda da Silva*⁴; *Paulo Ivan Fernandes Júnior*⁵

Resumo

Este trabalho teve como objetivo caracterizar bactérias potencialmente diazotróficas associadas ao sorgo cultivado no Semiárido pernambucano e avaliar estes isolados selecionados quanto à eficiência na promoção do crescimento vegetal. As bactérias foram crescidas em meio líquido e o DNA extraído com kit comercial. A amplificação foi realizada utilizando-se um par de marcadores universais e a purificação realizada com kits comerciais para posterior sequenciamento. As sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados EzBioCloud para a identificação. Para avaliar a eficiência de inoculação os isolados foram inoculados em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivado em vasos a pleno sol, junto aos tratamentos controle. As 11 bactérias foram enquadradas

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade Pernambuco (UPE), bolsista IC/CNPq, Petrolina, PE.

² Estudante Ciências Biológicas UPE, bolsista IC/Facepe, Petrolina, PE.

³ Estudante de Ciências Biológicas UPE, estagiário da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁴Bióloga, M.Sc. em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina, PE.

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

nos gêneros *Kosakonia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Rhizobium* e *Paraburkholderia*. Ao avaliar os resultados de eficiência na promoção do crescimento foram observadas diferenças significativas para as variáveis N total acumulado e teor de N, onde alguns isolados se destacaram pela eficiência de inoculação em comparação com os tratamentos nitrogenado e a estirpe de referência utilizada. Estes resultados indicam que o sorgo cultivado no Semiárido se associa a bactérias diazotróficas potenciais para a utilização como promotores de crescimento nesta cultura.

Palavras-chave: gramíneas, inoculante, fixação biológica de nitrogênio, diversidade.

Introdução

O Semiárido brasileiro é caracterizado por condições edafoclimáticas adversas à produção vegetal, o que dificulta o estabelecimento das culturas anuais. Muitas espécies forrageiras são caracterizadas pelas adaptações às condições de elevada temperatura e baixa disponibilidade hídrica. Desse modo, o cultivo de plantas forrageiras torna-se uma das melhores estratégias produtivas para a região. O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma das culturas tradicionais que se destaca pelo bom rendimento em condições de deficiência hídrica, o que o torna uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões semiáridas do mundo (CIAMPITTI; PRASAD, 2016).

Na rizosfera das plantas cultivadas, como o sorgo, encontram-se bactérias capazes de contribuir com a nutrição nitrogenada das plantas a partir da fixação biológica de nitrogênio. Variedades de plantas não leguminosas têm sido relatadas em associação a diferentes gêneros e espécies de bactérias diazotróficas (BALDANI, et al., 2014). A seleção dessas bactérias pode colaborar para a redução, ou mesmo a dispensa, do uso dos fertilizantes nitrogenados, reduzindo assim os custos de produção e o impacto ambiental da atividade agropecuária.

Atualmente, a inoculação de bactérias em plantas do sorgo podem promover respostas significativas (BERGAMASCHI et al., 2007). Porém, não há indicação de inoculantes para esta gramínea, sendo assim necessário estudos a fim de selecionar estirpes com grande potencial biotecnológico (REIS, 2007).

Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias potencialmente diazotróficas associadas ao sorgo cultivado no Semiárido pernambucano e avaliar estes isolados selecionados quanto à eficiência na promoção do crescimento vegetal.

Material e Métodos

As 11 bactérias avaliadas neste trabalho foram previamente obtidas e selecionadas por apresentarem a amplificação positiva de um fragmento do gene *nifH* e elevada produção de compostos indólicos in vitro (SILVA, 2017).

Os 11 isolados selecionados foram identificados por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Para tanto, o DNA foi extraído utilizando o Kit de comercial e a PCR foi realizada utilizando os iniciadores universais 27F e 1492R (WEISBURG et al., 1991).

As amostras de DNA foram purificadas com o kit comercial e enviadas para o sequenciamento na plataforma 3037 x/ na empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul). A qualidade das sequências foi avaliada utilizando-se o programa SeqScanner v 2.0 (Applied Biosystems) e a identificação de cada bactéria foi feita por meio da comparação com as sequências disponíveis no banco de dados EzBioCloud (www.ezbiocloud.net).

Para avaliar a eficiência na promoção do crescimento vegetal dos isolados, um ensaio foi conduzido com o cultivo de sorgo 'BRS Ponta Negra' em vasos a pleno sol. Os tratamentos consistiram na inoculação das sementes no momento do plantio com as 11 bactérias, além da estirpe de referência Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*), dois tratamentos sem inoculação e com a adubação

nitrogenada (50% e 100% de uma dose de 100 kg N ha⁻¹) e a testemunha absoluta (sem inoculação e sem adubação) em quatro repetições.

As plantas receberam água diariamente e foram coletadas aos 55 dias após o plantio para a determinação da massa das raízes e partes aéreas secas por pesagem. As amostras das partes aéreas seca foram moídas para quantificação do N por meio do método de combustão seca.

Os dados foram avaliados quanto à distribuição normal e submetidos à análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Skott-Knott ($p > 0,1\%$) utilizando-se o programa Sisvar 5.0.

Resultados e Discussão

Com a identificação dos 11 isolados por meio da comparação de suas sequências parciais do gene 16S rRNA com as disponíveis no banco de dados EzBioCloud, observou-se que seis bactérias foram classificadas como pertencentes ao gênero *Kosakonia*, duas ao gênero *Klebsiella*, e os gêneros *Rhizobium*, *Paraburkholderia* e *Enterobacter* apresentaram uma bactéria, cada (Tabela 1).

Esses gêneros são comumente isolados de gramíneas (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015; HAIYAMBO et al., 2015), entretanto, a sua capacidade de promoção do crescimento vegetal é variável, o que justifica a necessidade de estudos para avaliar a sua ocorrência e o seu potencial em plantas cultivadas no Semiárido (SILVA, 2017).

Tabela 1. Eficiência na promoção do crescimento vegetal de bactérias associativas isoladas inoculadas em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivado em condições de casa de vegetação.

Bactéria (tratamento)	Identificação	MPAS	MRS	MTS	Teor N (mg/g)	N total (mg/planta)
S02	<i>Kosakonia</i>	2,59 ^b	3,94 ^a	6,54 ^a	18,65 ^c	35,87 ^c
S03	<i>Kosakonia</i>	4,21 ^a	6,45 ^a	10,7 ^a	14,09 ^c	59,83 ^b
S04	<i>Kosakonia</i>	4,25 ^a	5,71 ^a	9,96 ^a	10,32 ^c	42,36 ^c
S05	<i>Kosakonia</i>	3,17 ^a	4,38 ^a	7,55 ^a	19,49 ^c	55,69 ^b
S06	<i>Kosakonia</i>	3,26 ^a	4,79 ^a	8,06 ^a	17,37 ^c	54,02 ^b
S07	<i>Kosakonia</i>	3,16 ^a	5,69 ^a	8,85 ^a	15,64 ^c	43,56 ^c
S11	<i>Enterobacter</i>	2,72 ^b	3,69 ^a	6,41 ^a	19,71 ^b	52,32 ^b
S12	<i>Klebsiella</i>	4,24 ^a	6,30 ^a	10,5 ^a	12,33 ^c	53,18 ^b
S13	<i>Rhizobium</i>	4,43 ^a	4,36 ^a	8,80 ^a	14,46 ^c	65,03 ^b
S15	<i>Klebsiella</i>	2,51 ^b	4,28 ^a	6,80 ^a	15,64 ^c	36,16 ^c
S16	<i>Paraburkholderia</i>	3,67 ^a	4,53 ^a	8,21 ^a	16,29 ^c	53,33 ^b
100N	-	4,37 ^a	4,10 ^a	8,48 ^a	34,97 ^a	142,13 ^a
50N	-	3,5 ^a	4,00 ^a	7,54 ^a	22,85 ^b	76,41 ^b
Test. Abs	-	3,15 ^a	3,45 ^a	6,61 ^a	13,64 ^c	40,15 ^c
Ab-V5	<i>A. brasilense</i>	3,43 ^a	6,05 ^a	9,49 ^a	15,53 ^c	51,39 ^b

Letras minúsculas comparação entre os isolados; letras iguais não diferem pelo teste de Skott-Knott a 10% ($p < 0,1$). MPAS: massa seca da parte aérea, MRS: massa seca da raiz, MTS: massa total seca, N total: nitrogênio total da parte aérea, Teor N: teor de nitrogênio.

Na avaliação da promoção do crescimento vegetal, os isolados inoculados foram avaliados em comparação com os tratamentos controles e não apresentaram diferenças significativas entre as médias para os parâmetros correspondentes à massa da raiz seca e massa total seca. Diferenças foram observadas em relação à massa da parte aérea seca com alguns isolados inferiores aos controles avaliados.

Os resultados mais positivos foram os observados em relação aos parâmetros da nutrição nitrogenada, destacando-se o teor de N na parte aérea para as plantas inoculadas com o isolado S11 de *Enterobacter* sp., que apresentaram médias iguais à observada no tratamento com 50% de N, sendo ainda superiores à estirpe de referência Ab-V5.

Avaliando-se o N total acumulado na parte aérea, sete isolados, sendo S03, S05 e S06 de *Kosakonia* sp.; S 11 de *Enterobacter* sp.; S12 de *Klebsiella* sp.; S13 de *Rhizobium* sp. e S16 de *Paraburkholderia* sp. apresentaram a capacidade de induzir o acúmulo de N em médias estatisticamente iguais àquela apresentadas pelos tratamentos nitrogenado com 50% de N e Ab-V5.

Esses resultados demonstram que estes isolados apresentam a capacidade de fornecer parcialmente o N demandado pela cultura do sorgo, indicando que estas bactérias podem ser aplicadas, quando associadas a outras estratégias de inoculação ou adubação, para suprir parcialmente a demanda de N fertilizante (TRABELSI; MHAMDI, 2013). O potencial das estirpes avaliadas indicam que os isolados devem ser testados em condições de campo, para assegurar o seu desempenho como promotor de crescimento vegetal.

Conclusão

As 11 bactérias avaliadas foram enquadradas em quatro diferentes gêneros que abrigam bactérias com potencial para a promoção do crescimento vegetal. Os isolados apresentam potencial para a promoção do crescimento do sorgo, com destaque para o isolado S11 de *Enterobacter* sp., cuja inoculação resultou em plantas com maiores teores de N na parte aérea e N acumulado na parte aérea.

Referências

- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, Cham, v. 384, p. 413-431, 2014.
- BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L. F. W; QUADROS, P. D.; CAMARGO, F. A. O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 37, p. 727-733, 2007.
- CIAMPITTI, I. A; PRASAD, P. V. V. Historical synthesis-analysis of changes in grain nitrogen dynamics in sorghum. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1-11, 2016.

FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; AIDAR, S. de T.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; ZILLI, J. E.; SOUZA, L. S. B.; MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; BRASIL, M. S.; SEIDO, S. L.; MARTINS, L. M. V. The resurrection plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 39, p. 993-1002, 2015.

HAIYAMBO, D. H.; CHIMWAMUROMBEL, P. M.; REINHOLD-HUREK, B. Isolation and screening of rhizosphere bacteria from grasses in east Kavango region of Namibia for plant growth promoting characteristics. **Current Microbiology**, Cham, v. 71, p. 566-571, 2015.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 232). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/34399/1/doc232.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2017.

SILVA, J. F. **Caracterização polifásica de bactérias promotoras de crescimento vegetal associados ao sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e ao milheto (*Penisetum glaucum* (L.) R. Brown) cultivados no Sertão de Pernambuco**. 2017. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.

TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. **BioMed Research International**, [London], v. 2013, p.1-11, 2013.

WEISBURG W. G.; BARNES S. M.; PELLETIER D. A.; LANE D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., v. 173, p. 697-703, 1991.