

# ***Fingerprinting* molecular de bactérias endofíticas isoladas de sementes de milho ‘BRS Gorutuba’**

*Eliomara Carmo Pereira<sup>1</sup>; Cláudia Silva Gomes Bomfim<sup>2</sup>; Valéria Borges da Silva<sup>3</sup>; Jéssica Caroline Souza Santos<sup>4</sup>; Paulo Ivan Fernandes Junior<sup>5</sup>*

## **Resumo**

Este trabalho teve por objetivo isolar e avaliar a variabilidade genética de bactérias presentes no interior das sementes do milho (*Zea mays* L.), cultivar BRS Gorutuba. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo na Embrapa Semiárido. As sementes foram sanitizadas e, em seguida, 20 g foram trituradas em 180 mL de solução salina esterilizada. Para o isolamento bacteriano, prosseguiu-se a diluição seriada até  $10^{-4}$ . As amostras foram espalhadas em placas de Petri em três diferentes meios de cultura (DYGS, YMA e ágar nutriente), em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C até o aparecimento das colônias bacterianas puras, que foram estocadas e depositadas na Coleção de Cultura de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA). Todos os isolados tiveram o DNA extraído com a utilização do kit de extração de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante. A avaliação da variabilidade genética foi realizada a partir da análise do *fingerprinting* molecular por meio da técnica de Box-PCR. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese e os perfis foram avaliados no programa *Bionumerics*. Foram obtidos 26 isolados bacterianos a partir das sementes do milho, que apresentaram grande variabilidade genética.

**Palavras-chave:** inoculantes, promoção de crescimento, simbiose, *Zea mays*.

<sup>1</sup>Estudante de Biologia – UPE, estagiária da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Mestranda da Univasf, Petrolina, PE.

<sup>3</sup>Professora do Instituto Federal do Piauí-IFPI, doutoranda em Ciência do Solo – UFPB, Areia, PB.

<sup>4</sup>Estudante de Biologia, bolsista Pibic/Embrapa, Petrolina, PE.

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

## Introdução

O milho é um cereal produzido e consumido em diversos países na alimentação animal e humana. O Brasil tem se destacado nos últimos anos como o terceiro maior produtor mundial do grão (CONAB, 2018). No Nordeste brasileiro, onde é bastante explorado pela agricultura familiar, possui grande representatividade na economia para os pequenos e médios agricultores.

Apesar de ser frequentemente cultivado com baixo aporte tecnológico, o milho é bastante exigente em nutrientes, sendo necessário até 90 kg de N ha<sup>-1</sup> para alcançar uma produção de 2 a 3 ton ha<sup>-1</sup> no Semiárido (Duete et al., 2009). A baixa produtividade em solos com baixa disponibilidade de nutrientes e a preocupação com os danos ambientais gerados pelo uso inadequado de fertilizantes na produção agrícola têm demandado pesquisas que possibilitem elevar os níveis de produtividade, sem prejuízos ao ambiente. Os trabalhos têm se voltado para a identificação de micro-organismos benéficos associados às plantas, capazes de promover crescimento vegetal em culturas cultivadas (Hungria et al., 2010; Alves et al., 2014).

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal pode trazer benefícios práticos para gramíneas por mecanismos como a fixação do nitrogênio atmosférico, solubilização de compostos minerais como fósforo, produção de sideróforos e produção de reguladores do crescimento vegetal (Arruda et al., 2013). Como resultado, é possível substituir, em parte, a adubação mineral, com incrementos no desenvolvimento da raiz, melhorando a absorção de nutrientes e água, além de reduzir os efeitos dos estresses ambientais. Esses benefícios representam aumento significativo na produtividade do milho (Alves et al., 2014).

O estudo de diversidade de bactérias associadas às gramíneas pode ajudar a conhecer as comunidades endofíticas comumente associadas, bem como identificar isolados com potencial para a produção de inoculantes que possam substituir, parcialmente, a utilização de fertilizantes químicos.

Este trabalho teve por objetivo isolar e avaliar a variabilidade genética da comunidade de bactérias associadas de sementes do milho cultivar BRS Gorutuba.

## Material e Métodos

As sementes de milho, cultivar BRS Gorutuba, foram sanitizadas, utilizando-se álcool 96 °GL por 30 segundos, hipoclorito de sódio 3% por 5 minutos e dez lavagens sucessivas com água destilada autoclavada (ADE). Em seguida, 20 g de sementes foram trituradas em 180 mL de solução salina esterilizada e prosseguiu-se a diluição seriada até  $10^{-4}$ . As amostras de todas as diluições foram espalhadas em placas de Petri, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em três diferentes meios de cultura (DYG's, YMA e ágar nutriente), em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C para o crescimento dos isolados. Os isolados foram repicados sucessivas vezes até a obtenção de colônias puras e depositados na Coleção de Cultura de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA).

Todos os isolados crescidos tiveram o DNA extraído utilizando-se o kit de extração de DNA genômico Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante.

A avaliação da variabilidade genética foi realizada a partir da análise do *fingerprinting* molecular por meio de reação de PCR, utilizando-se o iniciador Box-A1. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, fotografados em transiluminador UV e os perfis foram avaliados no programa Bionumerics 7.6.

## Resultados e Discussão

Foram obtidos 26 isolados endofíticos das sementes do milho. Pelo dendrograma de similaridade com base no *fingerprinting* dos isolados, por meio da técnica de Box-PCR, observaram-se nove Clusters distintos, com aproximadamente 60% de similaridade (Figura 1).

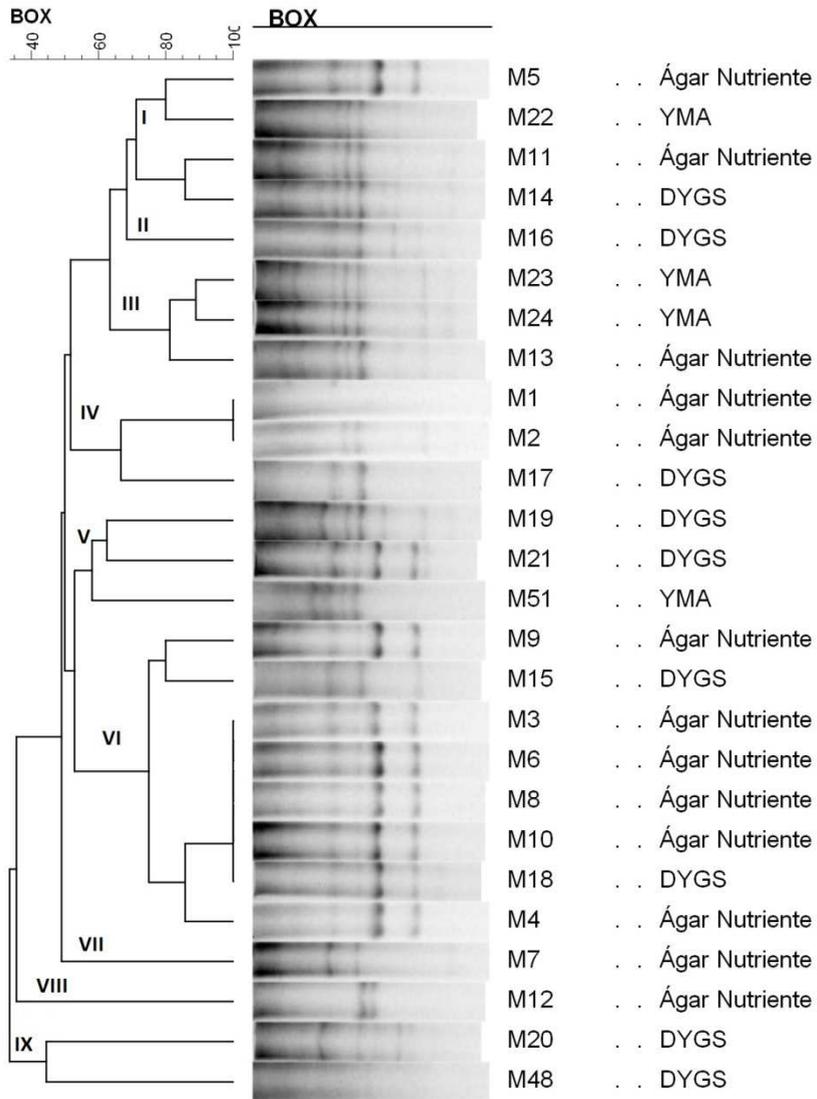
O Cluster I foi formado por 4 isolados crescidos nos três diferentes meios de cultivo. Os Clusters II, VII e VIII foram formados por apenas um isolado, o primeiro crescido em meio DYGS e os demais em ágar nutriente. Os Clusters III, IV, V e VI foram formados por isolados crescidos em pelo menos dois meios de cultura. No Cluster IX, foram agrupados apenas isolados crescidos em meio DYGS. Apenas nos Clusters IV e VI, observou-se a presença de isolados com 100% de similaridade. Os isolados M1 e M2, crescidos em meio ágar nutriente, no primeiro; os isolados M3, M6, M8, M10, crescidos em meio ágar nutriente e M18, crescido em DYGS, no segundo.

A técnica de Box-PCR permite identificar a presença de isolados idênticos. Logo, é possível inferir que os isolados M1 e M2; M3, M6, M8, M10 e M18 são clones. A baixa similaridade entre os demais isolados, independente do meio de cultura no qual foram crescidos, pode ser relacionada à alta variabilidade genética das bactérias endofíticas da semente do milho. A técnica de Box-PCR também foi utilizada por Vergara et al. (2014) com bactérias isoladas de diferentes solos, possibilitando identificar os isolados geneticamente diferentes e excluir possíveis clones.

Os resultados demonstraram maior abundância e variabilidade das bactérias obtidas das sementes de milho nos meios de cultivo DYGS e ágar nutriente. A utilização de diferentes meios de cultivo para o crescimento pode ser uma abordagem interessante para o isolamento de bactérias endofíticas do milho, uma vez que apresentou efeito discriminatório entre os isolados.

O isolamento e a caracterização de isolados bacterianos de *Oryza glumaepatula* (Poaceae) em solos do Cerrado de Roraima, realizado por Fernandes Júnior et al. (2013), indicaram grande diversidade entre a comunidade bacteriana, inclusive com a identificação de estirpes com potencial para a promoção de crescimento vegetal. As espécies da família Poaceae apresentam grande potencial para estabelecer interação com algumas bactérias que promovem o crescimento das plantas. Frequentemente, essas plantas são colonizadas por bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Sphingomonas*.

As bactérias endofíticas isoladas da semente podem ser benéficas para a germinação e o estabelecimento de plântulas, uma vez que já estão presentes nos estágios iniciais de crescimento das plantas (Truyens et al., 2014) e, possivelmente, irão colonizar os tecidos, podendo promover o crescimento da planta.



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade obtido a partir de perfis gerados por meio de Box-PCR.

## Conclusão

Existe grande diversidade de bactérias endofíticas na semente do milho que podem migrar para a parte aérea, raiz e rizosfera para promover o crescimento da planta.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa (03.13.08.003.00.00) e ao CNPq (311218/2017-2), pelo financiamento, à Universidade do Estado de Pernambuco e à Universidade Federal do Vale do São Francisco, pelo apoio institucional.

## Referências

- ALVES, G. C.; VIDEIRA, S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1, p 307-321, 2014.
- ARRUDA, L.; BENEDUZI A.; MARTINS, A.; LISBOA, B. B.; LOPES, C.; BERTOLO, F.; VARGAS, L. K.; Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, safra 2018/2019: terceiro levantamento**. Brasília, DF, v. 6, p. 1-127, dezembro, 2018.
- DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E.C.; AMBROSANO, E.J. Acúmulo de nitrogênio (15N) pelos grãos de milho em função da fonte nitrogenada em Latossolo Vermelho. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 463-472, 2009.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PEREIRA, G. M. D.; PERIN, L.; SILVA, L. M.; BARAÚNA, A. C.; ALVES, F. M.; PASSOS, S. R.; ZILLI, J. Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista de Biologia Tropical**, v. 61, n. p. 991-999, 2013.
- 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**, v. 331, n. 1/2, p. 413-425, 2010.
- TRUYENS S.; WEYENS N.; CUYPERS A.; VANGRONSVELD J. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, p. 40–50, 2014
- VERGARA, C.; LEITE, J.; ROSÁLIA, C. E.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ZILLI, J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversity and symbiotic performance of peanut rhizobia from Southeast region of Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 6, p. 566-577, 2014.