



# XXXIII

# Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

Solos nos biomas brasileiros: sustentabilidade e mudanças climáticas  
31 de julho à 05 de agosto - Center Convention - Uberlândia/Minas Gerais

## CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MILHO CULTIVADO EM RORAIMA

**Krisle da Silva<sup>(1)</sup>; Liamara Perin<sup>(2)</sup>; Maria de Lourdes Gomes<sup>(3)</sup>; Alexandre Cardoso Baraúna<sup>(4)</sup>; Gilmara Maria Duarte Pereira<sup>(5)</sup>; Jerri Édson Zilli<sup>(1)</sup>**

<sup>(1)</sup> Pesquisador em Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima, Endereço Rodovia BR-174 Km8, Distrito Industrial, CEP 69301-970, Boa Vista, RR; e-mail: [krisle@cpafr.embrapa.br](mailto:krisle@cpafr.embrapa.br); <sup>(2)</sup> Professora Adjunta do Instituto Federal de Sergipe, Campus Nossa Senhora da Glória, SE; <sup>(3)</sup> Analista Ambiental, Fundação Estadual do Meio Ambiente Ciência e Tecnologia de Roraima, Boa Vista, RR; <sup>(4)</sup> Mestrando em Agronomia, UFRR, Boa Vista, RR; <sup>(5)</sup> Pós-Doutoranda, UFRR, Embrapa-RR, Boa Vista, RR.

**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 cultivado em Roraima, através da caracterização genotípica. A caracterização genotípica foi avaliada através da análise de ARDRA 16S rDNA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado) de 26 bactérias diazotróficas isoladas de quatro cultivares de milho (Variedades BR106 e BR4157 e os híbridos BRS1010 e BRS 3003) cultivadas em área de cerrado e de mata. Foi verificada uma elevada diversidade genotípica entre as bactérias diazotróficas tanto em área de mata quanto em área de cerrado. Onze bactérias se agruparam com estirpes de bactérias utilizadas como referência, sendo seis semelhantes ao gênero *Azospirillum* e cinco ao gênero *Burkholderia*. Quanto aos cultivares, foi verificada maior diversidade entre as bactérias isoladas de variedades em relação aos híbridos. Os resultados indicaram que o genótipo da planta hospedeira seleciona determinadas estirpes bacterianas.

**Palavras-Chave:** *Zea mays*; ARDRA; Amazônia

### INTRODUÇÃO

Plantas de milho (*Zea mays* L.) são colonizadas por uma grande variedade de bactérias. Estas podem contribuir significativamente para o desenvolvimento vegetal e são conhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (Kloepper e Schroth, 1978). Um dos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento é a fixação biológica de nitrogênio (FBN). As bactérias que realizam a FBN são conhecidas como bactérias diazotróficas. Para a cultura do milho diversos gêneros de bactérias diazotróficas já foram relatados, como *Azospirillum* (Döbereiner e Pedrosa, 1987; Baldani et al., 1984; Mehnaz et al., 2007a e b) *Herbaspirillum* (Baldani et al., 1986), *Burkholderia* (Reis et al., 2004; Caballero-Mellado et al., 2004; Perin et al., 2006), *Paenibacillus* (von der Weid et al., 2002), etc.

Em estudo recente no Estado de Roraima foram isoladas bactérias diazotróficas de plantas de milho cultivadas em área de cerrado e de mata com elevada diversidade morfológica (Gomes, 2009). Posteriormente, foi verificado que essas bactérias possuem também elevada diversidade metabólica, sendo capazes de fixar nitrogênio atmosférico, produzir ácido indol acético e solubilizar fosfatos inorgânicos (Perin et al., 2010), o que evidencia o potencial para a promoção do crescimento vegetal. No entanto, não há estudos quanto a diversidade genotípica dessas bactérias associadas às plantas de milho.

A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas é ferramenta útil para o conhecimento da diversidade, sua distribuição no ambiente, e sua interação com diferentes genótipos vegetais. Para caracterização genotípica de bactérias, a técnica conhecida como ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal) é uma ferramenta útil e rápida para análise da diversidade (Grifoni et al., 1995). Os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais que sofrem poucas influências por mudanças no meio ambiente.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genotípica de bactérias diazotróficas isoladas de milho cultivado em Roraima.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Origem das bactérias diazotróficas*

Vinte e seis bactérias diazotróficas endofíticas isoladas do colmo e raízes de quatro cultivares de milho (os híbridos BRS 1010 e BRS 3003, e as variedades BRS 4157 e BR 106) (Gomes, 2009) foram estudadas. As plantas foram coletadas em áreas experimentais da Embrapa Roraima, no Campo Experimental Água Boa (CEAB), município de Boa Vista, representativo de área de cerrado (N 02° 15'00'' e W 60° 39'54'') e, no Campo Experimental Confiança (CEC), município do Cantá (N 02° 39'48'' e W 60° 50' 15''), que compreende uma região de mata. A capacidade em fixar nitrogênio foi detectada através do crescimento em meio semi-sólido livre de nitrogênio (Gomes, 2009) e presença do gene *nifH* (Perin et al., 2010).

#### *Extração do DNA genômico e amplificação do gene 16S rDNA*

A extração de DNA foi realizada através do kit RBC, Bioamérica (cat. YGB300). Para a caracterização genotípica, o gene 16S rDNA das bactérias foi amplificado

utilizando os iniciadores Y1 (Young et al., 1991) e B3 (Brosius et al., 1991 *apud* Haukka, 1996). Para 50 µl de reação foram utilizados: 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de dNTP; 0,12 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler®, Alemanha. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial (95°C por 2 min), 30 ciclos de desnaturação (93°C por 45 s), anelamento (62°C por 45 s), extensão (72°C por 2 min) e uma extensão final (72°C por 5 min). Cinco bactérias diazotróficas foram incluídas como referência: *Azospirillum amazonense* BR11140; *Azospirillum lipoferum* BR11080; *Burkholderia tropica* BR11366; *Burkholderia kururiensis* BR11340 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* BR11192.

#### Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

O produto amplificado foi clivado com cinco enzimas de restrição, *MspI*, *RsaI*, *HinfI*, *HaeIII* e *HhaI*. As condições para uma reação de 10 µl foram: 5U da enzima; 1,0 µL de tampão da enzima e 6 µL do produto do gene 16S rDNA amplificado. A reação foi incubada a 37°C por 12 horas. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose (3%) a 120 V por 4 horas. A visualização dos fragmentos foi realizada através da coloração com *Gel Red*, e fotografadas em sistema de fotodocumentação UVP.

#### Análise de agrupamento

Os perfis de restrição foram analisados e suas similaridades estimadas pelo coeficiente de Jacard e agrupadas pelo método UPGMA (average linkage clustering) utilizando o programa Bionumerics versão 6.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que há uma grande diversidade genotípica entre as bactérias isoladas do milho, ocorrendo poucos perfis com 100% de similaridade entre as bactérias isoladas e as estirpes referência (Figura 1). Foi possível verificar a formação de 5 grandes grupos considerando cerca de 40% de similaridade (Figura 1). No grupo G1 seis bactérias se agruparam com as estirpes referência de *Azospirillum*. No grupo G2, cinco bactérias foram agrupadas próximo a *Burkholderia kururiensis*, sendo que três delas apresentaram 100% de similaridade com esta estirpe. Já o grupo G3 foi composto por uma bactéria e uma estirpe referência de *Burkholderia tropica*, no entanto, seus perfis apresentam baixa similaridade. O grupo G4 foi composto apenas por cinco bactérias isoladas do milho, sendo quatro com o perfil semelhante em todas as enzimas avaliadas e acima de 90% de similaridade. O último grupo foi composto por nove bactérias, com perfis semelhantes nas enzimas *HaeIII*, *HhaI* e *HinfI*, mas com diferenças no padrão de bandas nas enzimas *MspI* e *RsaI*.

Quando comparado o perfil de ARDRA dos isolados com seu local de origem verificou-se que as bactérias oriundas de diferentes locais estão distribuídas em todos os grupos, mostrando haver pouca influência do ambiente. No entanto, quanto à

cultivar hospedeira (híbrido ou variedade), verificou-se uma maior diversidade genotípica das bactérias isoladas de variedades (Tabela 1). Bactérias isoladas da variedade de milho BRS 4157 estão distribuídas em todos os grupos, e da variedade BSR 106 em três grupos. Para as bactérias isoladas dos híbridos, foram encontradas em apenas dois grupos (Tabela 1). Estes resultados corroboram com os resultados anteriores obtidos por Gomes (2009) que verificou maior número de bactérias isoladas de variedades, as quais apresentaram maior índice de diversidade morfológica.

**Tabela 1.** Total de bactérias diazotróficas isoladas e distribuição dentro de cada grupo genotípico por 16S rDNA ARDRA nas cultivares de milhos BRS 1010 e BRS 3003 (híbridos) e BRS 4157 e BRS 106 (variedades).

Cultivares	Total de bactérias isoladas	Grupos Genotípicos
<b>BRS 1010</b>	4	2 e 5
<b>BRS 3003</b>	2	1 e 5
<b>BRS 4157</b>	14	1, 2, 3, 4 e 5
<b>BRS 106</b>	6	1, 2, 5

Os resultados obtidos evidenciam uma grande diversidade genotípica, correlacionando-se com estudos anteriores que detectaram uma elevada diversidade morfológica (Gomes, 2009) e metabólica (Perin et al., 2010). Esta diversidade encontrada entre os isolados representa um potencial para a promoção do crescimento em plantas de milho, principalmente em solos de baixa fertilidade e com baixo teor de matéria orgânica encontrados no Estado de Roraima.

Estudos futuros serão conduzidos com os representantes de cada grupo genotípico para verificar sua capacidade em promover o crescimento vegetal em plantas de milho.

### CONCLUSÕES

1. Existe uma grande diversidade genotípica entre as bactérias diazotróficas isoladas de milho.

2. A análise do ARDRA 16S rDNA indica que mais de 50% dos isolados não pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

### REFERÊNCIAS

- BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D., SELDIN, L., DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., 36: 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DÖBEREINER, J. A fourth azospirillum species from cereal roots. An. Acad. Bras. Ciênc., 56: 365-371, 1984.
- DÖBEREINER, J. e PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in on-leguminous crop plants. Science Tech, Madison, USA, 1987.155p.
- GOMES, M. L. Bactérias diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e de mata em Roraima. Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009, 66p. Dissertação de Mestrado.
- GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M.; DI SERI, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and

of the histidine operon. FEMS Microb. Lett, 127:85-91, 1995.

HAUKKA, K. Genetic diversity and phylogeny of rhizobial isolated from tropical tree legumes. Helsinki: University of Helsinki, 1997, 94p. Tese de doutorado.

KLOEPPER, J. W. e SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 4., 1978, Angers. Proceedings... Angers: Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, 1978. v. 2, p. 879-882.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 2805-2809, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 620-624, 2007b.

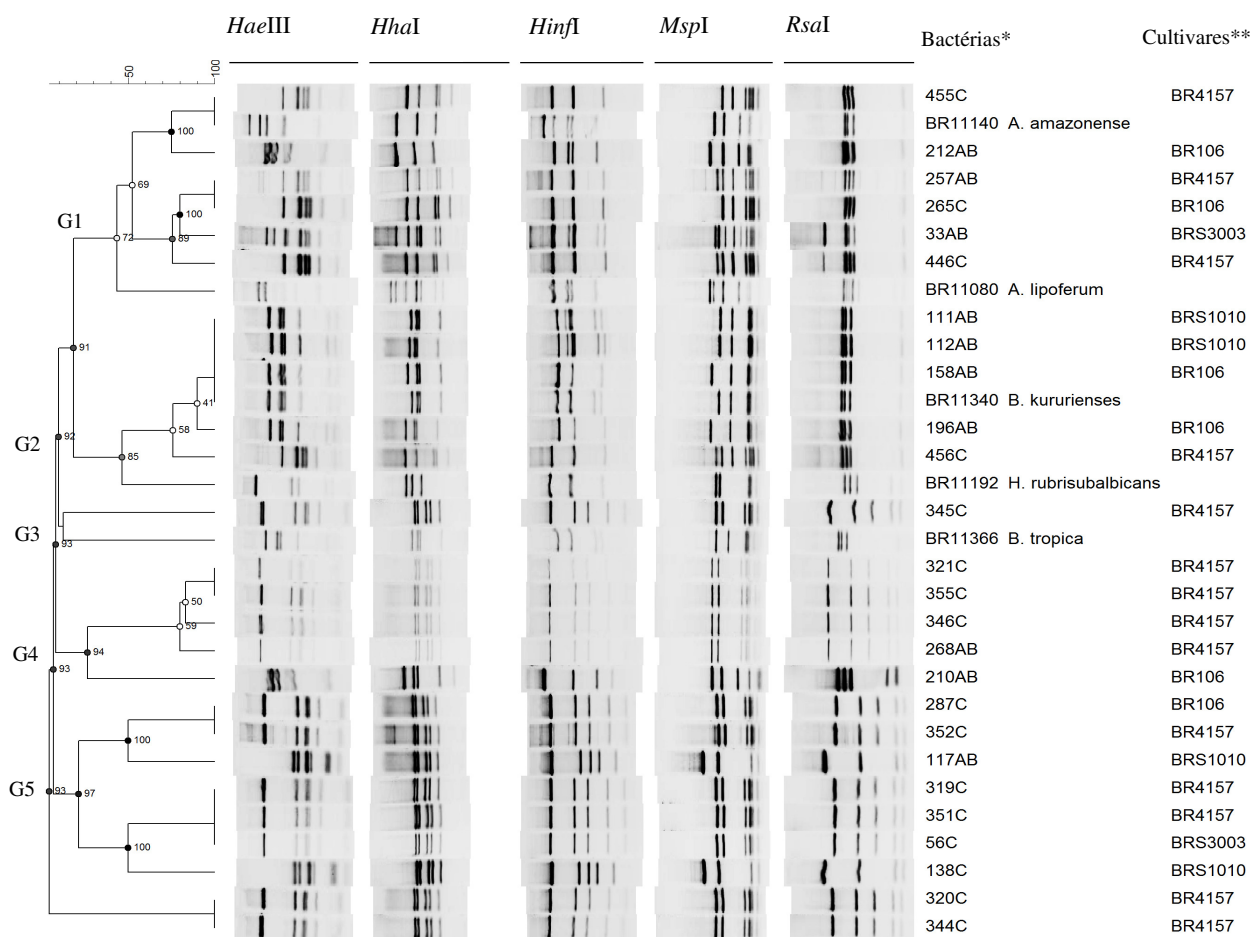
PERIN, L.; BARAÚNA, A. C.; PEREIRA, G. M. D.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; ZILLI, J. E. Caracterização polifásica de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho. In: FERTBIO, 2010.

Anais. Guarapari, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2010. CD-ROM

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56: 1931-1937, 2006.

REIS, V.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 2155-2162, 2004.

VON DER WEID, I.; DUARTE, G. F.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52: 2147-2153, 2002.



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade de perfil de ARDRA de bactérias diazotróficas isoladas de milho cultivado em Roraima e cinco estirpes referência. A similaridade dos perfis das cinco enzimas (*MspI*, *RsaI*, *HinfI*, *HaeIII* e *HhaI*) foi calculada utilizando o coeficiente de Jacard e agrupados pelo método UPGMA. \* C: campo experimental Confiança (mata); AB: campo experimental Água Boa (cerrado). \*\*Cultivares de origem: híbridos (BRS 1010 e BRS 3003) e variedades (BRS 4157 e BRS 106).