



FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho em Cultivos Convencional e Agroecológico

Dáfila Santos Lima Fagotti⁽¹⁾; **Paula Cerezini**⁽²⁾; **Jakeline Renata Marçon Delamuta**⁽²⁾; **Mariangela Hungria**⁽³⁾; **Marco Antonio Nogueira**⁽³⁾

⁽¹⁾ Doutoranda; Departamento de Agronomia/CCA; Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, PR; dafila.fagotti@gmail.com; ⁽²⁾ Pós-Graduandas; Departamento de Microbiologia/CCB; Universidade Estadual de Londrina; paulacerezini@yahoo.com.br; jake_renata@hotmail.com; ⁽³⁾ Pesquisador(a); Laboratório de Biotecnologia do Solo; Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, CEP 86001-970, Londrina, PR; hungria@cnpso.embrapa.br; nogueira@cnpso.embrapa.br

RESUMO - Diferentes gêneros de bactérias diazotróficas, além de fixar N₂ atmosférico, também promovem o crescimento de plantas pela produção de hormônios vegetais e disponibilização de outros nutrientes como o fósforo. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias diazotróficas endofíticas de milho (*Zea mays* L.) sob plantio direto e convencional, em sistema agroecológico e convencional. O isolamento foi realizado em meios de cultura livres de N (LGI, JNFb e JMV), totalizando 86 isolados. Por meio do sequenciamento do gene 16S DNAr foram identificadas bactérias dos gêneros *Burkholderia* spp., *Agrobacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Pseudoxanthomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Sphingomonas* sp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* sp., *Xanthomonas* sp., *Leclercia* sp., *Pantoea* sp., *Dyella* sp. e *Pseudomonas* spp. O gênero *Burkholderia* representou 30% dos isolados, seguido de *Agrobacterium* com 14%. O milho sob cultivo agroecológico apresentou mais isolados de bactérias endofíticas (24%). Assim, sistemas menos sujeitos a ações antrópicas parecem ser *hotspots* de diversidade para isolamento de microrganismos com potencial para promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chave: Plantio direto; Fixação biológica de nitrogênio; *Burkholderia*; 16S DNAr.

INTRODUÇÃO - A fixação biológica de N (FBN) em não-leguminosas tem sido mais intensamente estudada, com crescente interesse em estender esse benefício à cultura do milho (Chelius e Triplett 2001; Roesch et al., 2008).

Várias espécies de bactérias potencialmente fixadoras de N associadas a gramíneas foram identificadas, tais como *Azospirillum* spp., *Burkholderia* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Essas bactérias podem colonizar a rizosfera e/ou toda a planta e estabelecerem-se em nichos protegidos do excesso de oxigênio ou de outros fatores, o que lhes permite expressar seu potencial para FBN. Além dessas espécies reconhecidas como diazotróficas, outros gêneros de bactérias também são encontrados em associação com

gramíneas, por exemplo, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, entre outras (Chelius e Triplett 2001; Castro-González et al., 2011; Shu et al., 2012).

Assim, o conhecimento sobre a diversidade de bactérias associativas em sistemas de produção permite aumentar o potencial de aplicação de seus benefícios (Shu et al., 2012). Embora seja de senso comum que em sistemas de produção conservacionistas haja maior interação entre plantas e microrganismos, há poucos relatos de estudos sobre diversidade e abundância de bactérias diazotróficas endofíticas em sistemas orgânicos de produção de milho.

O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias diazotróficas endofíticas de milho cultivado em sistema convencional e agroecológico, e identificá-las com base no sequenciamento do gene 16S RNAr.

MATERIAL E MÉTODOS - O isolamento das bactérias diazotróficas endofíticas foi realizado em março de 2009, em amostras da intersecção entre a raiz e o caule (coroa) de plantas de milho cultivadas sob diferentes sistemas de produção (Tabela 1).

Foram coletadas dez plantas no estágio de florescimento, em cinco pontos de cada sistema de produção, totalizando 50 amostras. Estas foram lavadas em água corrente, tiveram a superfície desinfestada com álcool 70% (3 min) e hipoclorito comercial a 20% (5 min), e em seguida colocadas em uma solução tampão fosfato (0,05 M), enxaguadas em água estéril novamente. Amostras de tecido cortical de duas plantas (por ponto coletado) foram trituradas em 90 mL de solução salina estéril 0,85%. Alíquotas de 50 µL deste macerado foram inoculadas em frascos contendo 5 mL dos meios semi-sólidos LGI, JNFb e JMV (Vieira et al., 2007).

Após incubação durante 7 dias a 30 °C no escuro, os frascos apresentando crescimento típico foram utilizados para isolamento após quatro reinoculações sequenciais no mesmo meio de cultura (Vieira et al., 2007). Após esses procedimentos, os isolados foram inoculados em meio Dygs sólido para confirmar ausência de contaminação (Vieira et al., 2007), e em seguida foram

criopreservados, liofilizados e depositados na coleção de culturas da Embrapa Soja (Londrina-PR-Brasil).

Extração do DNA genômico dos isolados

Os isolados foram cultivados em meio Dygs líquido por um dia e centrifugados. O pelete foi utilizado para a extração do DNA genômico com o Kit para DNA bacteriano D3350-02 (Omega Bio-tek, USA) de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado em gel de agarose 1%, utilizando como padrão de DNA o marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen, Brasil) e coloração com brometo de etídio.

Amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr

O DNA de cada isolado bacteriano foi amplificado com os oligonucleotídeos universais FD1 (8-AGAGTTTGATCCTGCCTCAG-28) e RD1 (1525-AAGGAGGTG ATCCAGCC-1541). O volume final da PCR foi de 50 µL, sendo 37 µL de água, 5 µL de Tampão 10X (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl); 3 µL dNTP (Invitrogen, Brasil); 1,5 µL de MgCl₂ (3mM); 1,5 µL de cada *primer* FD1 e RD1; 0,25 U de Taq polymerase (Invitrogen, Brasil); e 20 ng/µL de DNA molde. A temperatura do ciclo da amplificação foi 95 °C por 2 min; seguindo de 30 ciclos de desnaturação de 94 °C por 15 seg; 93 °C por 45 seg; anelamento 55 °C por 45 seg; e extensão 72 °C por 5 min, em Termociclador DNA Engine gradient cyler (Research INC, USA) (Menna et al., 2006).

Produtos purificados de PCR (kit de purificação PCR PureLink™, Invitrogen, Brasil) de cada isolado (80 ng por reação) foram amplificados com iniciadores FD1, 362f (região alvo 339-362) (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3'), 786f (região alvo 764-786) (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3'), 1230f (região alvo 1179-1203) (5'-GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC-3') e Y2 (Menna et al. 2006). O sequenciamento foi realizado no sequenciador capilar MEGA BACE 1000 (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Sequências de alta qualidade foram obtidas para cada estirpe e reunidas em contigs utilizando o programa Phred Phrap e Consed. Sequências confirmadas na direção 3' e 5' foram submetidas ao banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para buscar alinhamentos significativos. Conforme a similaridade que cada isolado obteve com gêneros obtidos no banco de dados, alinhamentos múltiplos foram realizadas com o programa ClustalX versão 1.83 utilizando as sequências obtidas com maior similaridade entre si, além de sequências obtidas de genomas de estirpes Tipo bacterianas que apresentaram homologia com as sequências dos isolados em estudo. A árvore filogenética foi gerada utilizando o programa MEGA versão 5 com parâmetros padrão, modelo de distância K2P e o algoritmo Neighbour-joining. Suporte estatístico para os nós da árvore foi avaliado por análises de *bootstrap* com 1000 amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO - Foram obtidos 86 isolados (23 isolados em LGI, 37 em JNFb, e 26 em JMV). Os gêneros *Burkholderia*, *Agrobacterium* e *Stenotrophomonas* estiveram presentes em todas as áreas

avaliadas. As áreas foram homogêneas quanto ao número de gêneros isolados (entre 7 e 8 cada), porém variaram quanto aos diferentes gêneros. Por exemplo, somente na área 1 estava presente os quatro isolados do gênero *Microbacterium* (2315; 2316; 2317 e 2318) e na área 5 os dois isolados de *Bacillus* (2383 e 2384). A área 2 apresentou o maior número de *Burkholderia* e *Agrobacterium* (9 e 5, respectivamente). Já na área 3 foram obtidos sete isolados de *Burkholderia* e três dos cinco de *Pseudoxanthomonas*.

A maior ocorrência entre os isolados do gênero *Burkholderia* (30% de 86 isolados), seguido de *Agrobacterium* (14%) e a menor ocorrência foi dos gêneros *Dyella* e *Pseudomonas* (1% cada). Quando se observa a ocorrência dos isolados nos diferentes sistemas de produção, pode-se observar que a área sob sistema agroecológico (área 3) apresentou a maior ocorrência, com 24% de 86 isolados.

A possibilidade de encontrar bactérias diazotróficas endofíticas com potencial para promover o crescimento de plantas é maior em sistemas agroecológicos, devido à ausência de pesticidas e entradas de fertilizantes químicos, e conseqüentemente, o aumento da diversidade microbiana associada à planta. Por exemplo, neste estudo o cultivo sob plantio direto em sistema agroecológico foi o que apresentou maior ocorrência de bactérias diazotróficas. Em cultivos de arroz orgânico sob diferentes épocas de adoção, a densidade e diversidade de bactérias diazotróficas aumentou com o tempo de adoção do sistema, incluindo *Alfa*, *Beta* e *Gamaproteobacteria* (Shu et al., 2012).

Foram construídas cinco árvores filogenéticas com as sequências de genes 16S RNAr com base na maior similaridade entre os isolados. Foi construída uma árvore para a classe *Betaproteobacteria*, com os 26 isolados do gênero *Burkholderia* spp. (Figura 1A). Para a construção da árvore da classe *Alphaproteobacteria*, os isolados mais similares a *Agrobacterium* spp. (12), *Rhizobium* spp. (6) e *Sphingomonas* spp. (3) foram agrupados juntamente com as bactérias tipo (Figura 1B). Foram construídas duas árvores filogenéticas para a classe *Gammaproteobacteria*. A primeira foi formada pelos isolados do gênero *Stenotrophomonas* spp. (9), *Pseudoxanthomonas* sp. (6), *Xanthomonas* sp. (1) e *Dyella* sp. (1), juntamente com as bactérias tipo (Figura 1C); a segunda foi formada pelos gêneros *Enterobacter* spp. (10), *Leclercia* sp. (2), *Klebsiella* spp. (2), *Pantoea* sp. (1) e *Pseudomonas* sp. (1) e as bactérias tipo para cada gênero (Figura 1D). Finalmente, os isolados dos gêneros *Microbacterium* spp. (4) e *Bacillus* spp. (2) formaram a última árvore filogenética (classe *Actinobacteridae* e *Bacilli*, respectivamente) associada às bactérias tipo (Figura 1E). Apenas essa última árvore é formada por bactérias Gram-positivas e todas as outras são Gram-negativas.

Alfa, *Beta*, *Gamaproteobacteria* e Firmicutes são relatadas na literatura como bactérias diazotróficas (Shu et al., 2012) em diferentes culturas.

Considerando os isolados obtidos em meio semi-sólido LGI livre de N, desenvolvido para o isolamento de

Azospirillum amazonense (Videira et al. 2007), nenhum isolado desse gênero foi encontrado. Este resultado indica que LGI suporta o crescimento de outras bactérias diazotróficas, dado que os isolados pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Pseudoxanthomonas*, *Klebsiella*, *Leclercia* e *Dyella* foram obtidos nesse meio de cultura, sendo que a maioria desses gêneros já foi encontrada no interior de raízes de milho (Chelius e Triplett 2001; Roesch et al., 2008).

O meio de cultura JNFb é utilizado para o isolamento de *Herbaspirillum* spp., que são bactérias endofíticas (Videira et al. 2007). Neste trabalho, as bactérias isoladas em JNFb estão relacionadas aos gêneros *Stenotrophomonas*, *Rhizobium* e *Microbacterium*. Estudos anteriores relataram *Stenotrophomonas maltophilia* (Chelius e Triplett 2001) e *Rhizobium* spp. (Roesch et al., 2008) como bactérias vivendo endofiticamente em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho. O fato de encontrar o gênero *Rhizobium* em raízes de milho não é raro. Roesch et al. (2008) encontraram alguns gêneros restritos ao caule do milho a partir do sequenciamento do gene nifH, entre os quais havia *Rhizobium* spp.

O meio de cultura JMV tem sido utilizado para o isolamento de *Burkholderia* spp., o que é coerente com a maioria dos isolados obtidos nesse meio, cujos crescimentos típicos formam película amarelo-laranja, devido à acidificação do meio (Videira et al. 2007). Apesar das preocupações sobre a patogenicidade do grupo *B. cepacia*, muitas outras espécies de *Burkholderia* não patogênicas (*B. unamae*, *B. xenovorans*, *B. tropica*, *B. caribens* e *B. silvatlantica*) são filogeneticamente distintas de *B. cepacia* (Castro-González et al. 2011) e, assim, têm potencial para uso como promotoras de crescimento de plantas.

CONCLUSÕES - Plantas de milho provenientes de sistemas de produção agroecológico propiciaram a obtenção de maior quantidade e diversidade de isolados bacterianos endofíticos, com maior prevalência de bactérias diazotróficas pertencentes às classes *Alfa*, *Beta* e *Gamaproteobacteria*, *Actinobacteridae* e *Bacilli*.

REFERÊNCIAS

CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant Soil** 345:155–169, 2011.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays*. **L. Microb Ecol**, 41:252-263, 2001.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Syst Appl Microbiol**, 29:315-332, 2006.

ROESCH, L.F.W.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant Soil**, 302:91-104, 2008.

SHU, W.; PABLO, G.P.; JUN, Y.; DANFENG, H. Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management. **World J Microbiol Biotechnol**, 28:493-503, 2012.

VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDAN, I. V.L.D.; **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007, 74p.

Tabela 1 Histórico das áreas de onde foram obtidas plantas de milho para isolamento das bactérias diazotróficas endofíticas e o número do isolado nas respectivas áreas.

Área	Cidade/ Estado	Coordenada	Variedade	Sistema	Semeadura	Pó de Rocha	Nº do Isolado
1 e 2	Canoinhas SC	26°12' 55.92" S 50°34' 2.62"	Caiano	Convencional	Direta ² na ervilhaca	1 ton/ha (pó de basalto)	2312-2326 e 2327-2345
3	Porto União SC	26°18' 23.48" S 51°10' 5.57"	Fortuna	Agroecológico ¹	Direta ³ na aveia preta+ ervilhaca	1 ton/ha (pó de basalto)	2346-2366
4 e 5	São João do Triunfo PR	25°36' 13.32" S 50°22' 40.88" O	Amarelo antigo	Conv. (roçada manual e fogo)	Convencional	-	2367-2381 e 2382-2397

Anos de adoção do sistema: ¹ 3 anos; ² 1 ano; ³ 8 anos.

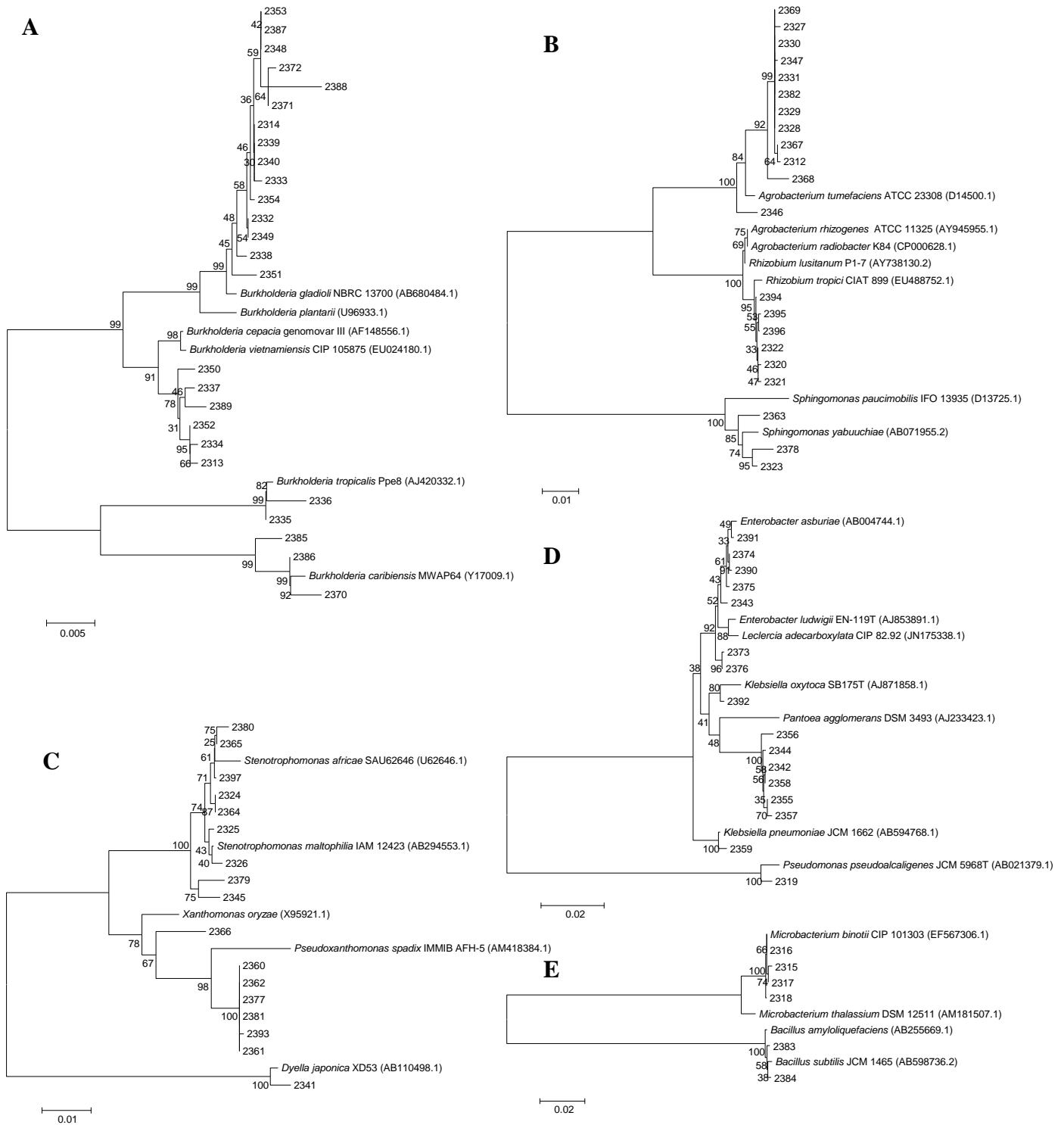


Figura 1 - Árvores filogenéticas mostrando as relações entre isolados bacterianos diazotróficos endofíticos dos vários gêneros obtidos do córtex de milho sob diferentes sistemas de cultivo, com sequências de 16S DNAr de espécies Tipo depositadas no *GenBank*. As árvores foram construídas utilizando o método Neighbour-joining, com base numa comparação de 1300 nucleotídeos. Os números indicados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 replicações de bootstrap. (A) *Burkholderia* spp.; (B) *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp. e *Sphingomonas* spp.; (C) *Stenotrophomonas* spp., *Xanthomonas* sp., *Pseudoxanthomonas* sp. e *Dyella* sp.; (D) *Enterobacter* spp., *Leclercia* sp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* sp. e *Pseudomonas* sp.; (E) *Microbacterium* spp. e *Bacillus* spp.