

## PADRONIZAÇÃO DA INOCULAÇÃO DA BACTÉRIA HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE EM MILHO (ZEA MAYS L.).

Milena Eloisa Ribeiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Larissa Fonseca Tomazini (co-autor), Gabriel Machado de Freitas (co-autor), Marco Aurelio Schüler de Oliveira (Orientador), e-mail: (masoliveira2@uem.br).

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas, PR.

### Bioquímica, Bioquímica dos Microrganismos

**Palavras-chave:** Milho, *Herbaspirillum seropedicae*, Inoculante.

#### Resumo:

O agronegócio é altamente dependente do uso de fertilizantes nitrogenados, os quais têm elevado custo e causam prejuízos ambientais. Desta forma, o estudo de tecnologias alternativas para a substituição dos fertilizantes nitrogenados se faz necessário. *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio, capaz de colonizar os tecidos internos de plantas. Assim, esse projeto objetiva estabelecer um protocolo de inoculação de milho (*Zea mays* L.) com *H. seropedicae*. A bactéria foi cultivada em meio NFbHP-malato líquido. As sementes de *Z. mays* foram selecionadas, esterilizadas, lavadas e então semeadas em papel germitest e germinada. Em seguida foram inoculadas com *H. seropedicae* e então transferidas para tubos de ensaio, em meio semi-sólido com diferentes concentrações de nitrato, que foram mantidos em câmara de germinação. Os resultados indicaram que houve aumento do número de raízes adventícias em 28,3% nas plantas inoculadas com bactérias e crescidas na concentração de 0,5 mM de nitrato, sugerindo o sucesso do protocolo para inoculação de plântulas de milho com *H. seropedicae* e o efeito benéfico da bactéria no crescimento.

#### Introdução

O Nitrogênio (N) é geralmente o fator limitante para a produtividade das culturas agrícolas, justificando a grande demanda por fertilizantes nitrogenados na agricultura. Uma alternativa para a fertilização nitrogenada é a inoculação das culturas com bactérias fixadoras de nitrogênio, conhecidas como diazotróficas, que podem promover um aumento na produtividade. Essas bactérias geralmente promovem o crescimento da planta pela produção e liberação de reguladores de crescimento e fornecem nitrogênio biologicamente fixado. Apesar da inoculação de culturas com bactérias rizóbios ser uma tecnologia amplamente empregada comercialmente, culturas de gramíneas, tal como o milho, não podem ser beneficiadas essa tecnologia, já que não são capazes de formar nódulos típicos da colonização de plantas por rizóbios. O desenvolvimento de um inoculante com

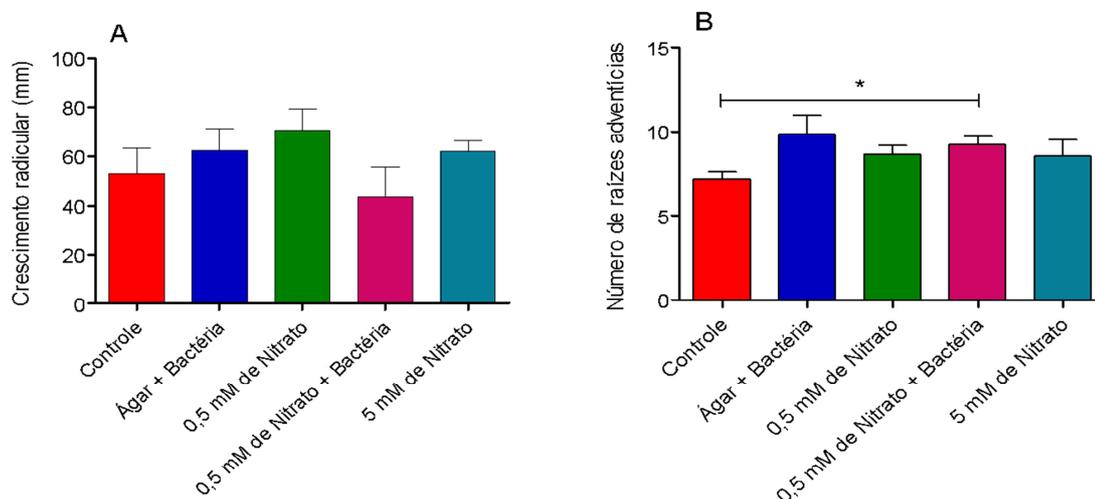
bactérias promotoras de crescimento de vegetal para gramíneas teria um gigantesco interesse ambiental e econômico. Em tal perspectiva, muitas bactérias diazotróficas endofíticas, capazes de colonizar tecidos internos de gramíneas, têm sido isoladas e caracterizadas. Este grupo inclui a bactéria que o presente projeto pretende estudar: *Herbaspirillum seropedicae*, sendo essa capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar nenhum dano aparente ao hospedeiro (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1997). Evidências recentes apontam que o nitrogênio fixado por *H. seropedicae* é incorporado na biomassa da planta hospedeira (PANKIEVICZ *et al.*, 2015). Esses fatores fazem com que *H. seropedicae* tenha grande potencial para ser utilizado como um biofertilizante, sendo uma alternativa mais eficiente e menos poluente que os fertilizantes nitrogenados.

## Materiais e Métodos

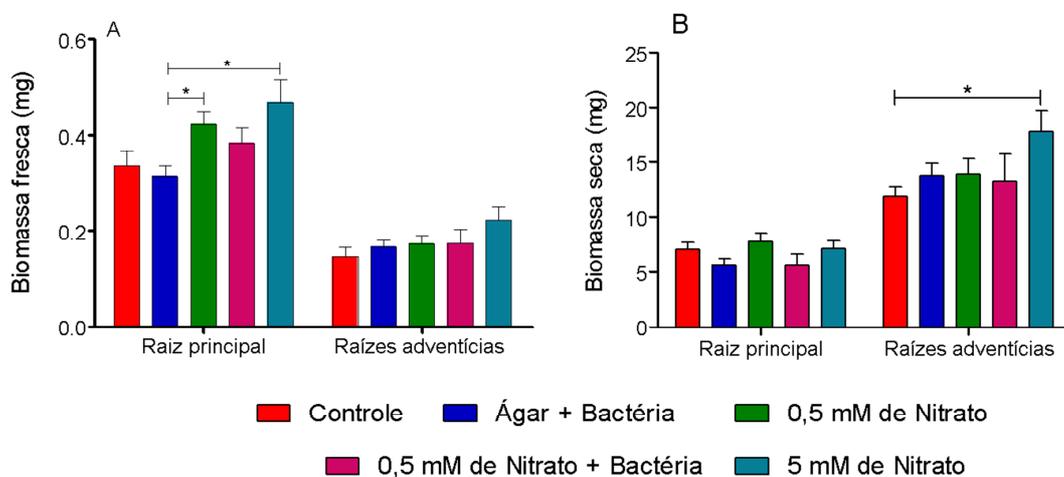
A bactéria foi cultivada em meio NFbHP-malato líquido (KLASSEN *et al.*, 1997), suplementado com o antibiótico estreptomicina 80 mg/mL e 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl, a 30 °C, sob agitação a 130 rpm, por 24 horas. As sementes de milho foram selecionadas, esterilizadas superficialmente em hipoclorito de sódio 2% e lavadas abundantemente em água destilada (BRASIL, 2009). Em seguida, foram semeadas em rolos de papel *germitest* umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco e após à semeadura. Os rolos foram levados para câmara de germinação, com fotoperíodo de 12 horas, a temperatura constante de 30 °C, por 96 horas. Raízes de milho com 20 a 30 mm foram mergulhadas na suspensão bacteriana, na concentração de 3x10<sup>8</sup> células (CANELLAS *et al.*, 2012). A cultura autoclavada foi utilizada como controle. Após 30 min de incubação, as plantas foram transferidas para tubos de ensaio com 25 mL de meio com ágar semi-sólido 0,8% (p/v) em diferentes concentrações de nitrato: 0 mM (controle), 0,5 mM e 5 mM. As plantas foram mantidas em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, a 25 °C por 7 dias.

## Resultados e Discussão

Os seguintes parâmetros biométricos foram usados para avaliar a inoculação de *H. seropedicae* na plântula de milho: comprimento radicular, número de raízes adventícias, peso da biomassa fresca e peso da biomassa seca. O comprimento radicular das plântulas não foi alterado de forma significativa (Figura 1A). As raízes adventícias foram quantificadas para cada plântula. No tratamento com inóculo de *H. seropedicae*, o meio semi-sólido com concentração de 0,5 mM de nitrato apresentou aumento de 28,32% para o número de raízes adventícias quando comparado ao tratamento controle (Figura 1B). Em seguida, foi pesada a massa fresca das plântulas. O tratamento com meio semi-sólido na concentração de 0,5 mM e 5 mM de nitrato houve aumento significativo na biomassa fresca da raiz principal em 38,4% e 49,1%, respectivamente, em comparação as plântulas inoculadas com *H. seropedicae* (Figura 2A). Com relação à massa seca, o tratamento em meio semi-sólido com concentração de 5 mM de nitrato apresentou estímulo de 49,87% em relação ao tratamento controle.



**Figura 1:** Crescimento radicular (mm) (A) e Número de raízes adventícias (B) de milho crescido na presença ou ausência de nitrato e de inóculo com *H. seropedicae*. Os valores são as médias  $\pm$  EP (n=). (\*) Indica diferença significativa entre o controle e 0,5 mM de Nitrato + Bactéria de acordo com Teste T pareado.



**Figura 2:** Biomassa fresca da raiz principal e das raízes adventícias (A) e Biomassa seca da raiz principal e das raízes adventícias (B) de milho crescido na presença ou ausência de nitrato e de inóculo com *Herbaspirillum seropedicae*. Os valores são as médias  $\pm$  EP (n=). (\*) Indica diferença significativa entre o controle e 0,5 mM de Nitrato + Bactéria de acordo com Teste T pareado.

## Conclusões

O trabalho conseguiu estabelecer um protocolo para a inoculação de plantas de milho com a bactéria *H. seropedicae* em escala laboratorial. A inoculação da planta

com a bactéria provocou um aumento do número de raízes adventícias, indicando um efeito benéfico da inoculação. O protocolo desenvolvido nesse trabalho será utilizado para testes de efetividade de estirpes mutantes de *H. seropedicae* para prospecção de linhagens com maior capacidade de estímulo de crescimento da planta.

## Agradecimentos

Agradecimentos à UEM, ao CNPq, à CAPES, à FINEP e ao laboratório de oxidações biológicas que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto. Ao encontro EAIC 31, pela oportunidade de divulgar este trabalho.

## Referências

BALDANI, J. I. *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: SDA/CGAL, 2009. 202p.

CANELLAS, Luciano Pasqualoto *et al.* A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil**, [S. l.], v. 366, p. 119–132, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1382-5>.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 43, p. 887-891, 1997.

OLIVARES, Fábio L. *et al.* Infection sugar cane of mottled varieties stripe by the *Herbaspirillum* resistant and endophytic diazotroph. **New Phytologist**, [S. l.], v. 135, n. 4, p. 723–737, 1997.

PANKIEVICZ, Vânia C. S. *et al.* Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal**, [S. l.], v. 81, p. 907–919, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tpj.12777>.