



PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Letícia C. **Oliveira**¹; Raquel P. **Freitas-lório**²; Adriana P.D. **Silveira**³

Nº 14126

RESUMO – *Bactérias endofíticas são importantes por seu potencial biotecnológico e muitos trabalhos têm demonstrado que esses microrganismos podem promover o crescimento de plantas por diferentes mecanismos: diretos, como a fixação biológica do N₂ (FBN), produção e liberação de substâncias que regulam o crescimento das plantas, tais como auxinas, giberelinas e citocininas, e aumento da solubilização e entrada de nutrientes, ou indiretos, pela supressão de patógenos por produção de sideróforos ou antibióticos. O objetivo do projeto foi avaliar isolados de bactérias endofíticas, com potencial ou não para fixação biológica de nitrogênio, quanto à promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar. Foram utilizados 16 isolados, previamente selecionados como promotores de crescimento de mudas micropropagadas, sendo que seis possuem o gene *nifH* (aptos a realizar FBN) e dez isolados que não apresentam tal gene. A maioria dos isolados aumentou a produção de massa de matéria seca da parte aérea e da raiz, mas não alterou o número de perfilhos assim como a atividade das enzimas redutase do nitrato e sintetase da glutamina.*

Palavras-chaves: bactérias promotoras de crescimento de planta, enzimas do metabolismo do nitrogênio

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP; leticia.cubines21@hotmail.com

2 Colaborador, Bolsista CAPES: Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical, IAC, Campinas-SP;

3 Orientador: Pesquisador do Instituto Agrônomo, Campinas-SP; apdsil@iac.sp.gov.br



ABSTRACT- *Endophytic bacteria are important for their biotechnological potential and many studies have demonstrated that these microorganisms can promote plant growth by several mechanisms: direct as biological nitrogen fixation (BNF), production and release of substances that regulate plant growth, such as auxins, gibberellins and cytokinins, and increased solubilization and nutrient input, or indirect, as pathogens suppression by siderophore or antibiotics production. The aim of the project was to evaluate isolates of endophytic bacteria, with or without potential for biological nitrogen fixation, in promoting sugarcane plantlets growth. Sixteen isolates, previously selected as growth promoters of plantlets, were tested; six of them have the nifH (able to perform BNF) and ten isolates do not exhibit such gene. Most isolates increased shoot and root dry matter production, but did not alter the number of tillers and the activity of nitrate reductase and glutamine synthetase.*

Key-words: plant growth-promoting bacteria, enzymes of nitrogen metabolism

1 INTRODUÇÃO

A interação entre plantas e bactérias endofíticas tem sido estudada principalmente devido aos resultados promissores de promoção de crescimento da planta (Ryan et al., 2007). Bactérias endofíticas podem desempenhar um papel importante na reabilitação e sustentabilidade de diferentes ecossistemas, diretamente pela fixação biológica do N₂ (FBN), produção e liberação de substâncias que regulam o crescimento das plantas, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (Neroni e Cardoso, 2007), e aumento da solubilização e entrada de nutrientes, ou indiretamente pela supressão de patógenos por produção de sideróforos ou antibióticos (Asghar et al., 2002). Na última década intensificaram-se os estudos com bactérias endofíticas pela sua potencialidade como agente de promoção de crescimento e proteção de plantas (Marques Junior et al., 2008).

A presença e permanência de bactérias endofíticas, assim como as bactérias presentes na rizosfera, são influenciadas por fatores bióticos e abióticos (Seghers et al., 2004), sendo que as bactérias endofíticas podem sofrer menor influência desses fatores (Hallmann et al., 1997). Normalmente a quantidade de bactérias endofíticas é menor que a de bactérias rizosféricas ou de patogênicas. A presença e o efeito benéfico de bactérias endofíticas já foram constatados em inúmeras espécies vegetais de interesse econômico, como arroz (Rodrigues et al., 2006), café (Ricci et al., 2005), dendê (Carvalho et al., 2006), gramíneas forrageiras (Brasil et al., 2005),



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

bananeiras (Weber et al., 2000), cana (Reis et al., 1999; Barbosa et al., 2006), trigo (Sala et al., 2008), plantas cítricas (Fernandes, 2012) entre outras.

Freitas (2011), estudando 162 isolados de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar, observou que 24 mostraram-se promissores por apresentarem promoção de crescimento de muda micropropagadas (aumento na massa de matéria seca da parte aérea e da raiz, maior acúmulo de N, maior IEU do N e aumento na atividade da enzima redutase do nitrato), promovendo um aumento de 66% na produção de matéria seca da parte aérea, 54% de raiz e 47% no N acumulado.

A cana é beneficiada pela associação com bactérias diazotróficas, sendo que, entre as gramíneas, é a cultura que recebe maior contribuição do processo de FBN (Barbosa et al., 2006). Oliveira et al. (2002) estimaram em seus estudos, utilizando diluição de ^{15}N -isótopo, que mais de 60% do nitrogênio total acumulado em algumas variedades de cana foi derivado da FBN. Urquiaga et al. (1992) observaram, em plantas micropropagadas de cana, uma contribuição da FBN de até 30% do nitrogênio total, pela inoculação de uma mistura de cinco espécies de bactérias.

O trabalho teve como objetivo a avaliação de isolados previamente selecionados de bactérias diazotróficas, com e sem capacidade de realizar FBN, quanto à promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar, obtidas por gemas, e atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS POR ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DO DNA RIBOSSOMAL 16S.

Para a identificação molecular dos isolados, estes foram repicados para tubos contendo o meio Dygs para crescimento por aproximadamente dois dias e, posteriormente, realizou-se a extração do DNA genômico com a utilização do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). O gene 16S rRNA foi amplificado na reação de PCR com os primers 27f (AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG) e 1492r (GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T), os quais são primers universais para o domínio Bactéria. A partir dos produtos da PCR realizou-se o sequenciamento no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, CBMEG - UNICAMP.

Foram realizados dois experimentos: experimento 1 – foram utilizados 6 isolados (IAC/BE-090, IAC/BE-095, IAC/BE-099; 2. IAC/BE-133, IAC/BE-137, IAC/BE-144), selecionados previamente por Freitas (2011), que promoveram o crescimento de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar em casa de vegetação e apresentaram o gene *nifH*, mostrando assim potencial



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

para fixação biológica de nitrogênio; experimento 2 – foram utilizados 10 isolados bacterianos não fixadores de nitrogênio (IAC/BECa-101, IAC/BECa-112, IAC/BECa-117, IAC/BECa-128, IAC/BECa-135, IAC/BECa-140, IAC/BECa-141, IAC/BECa-146, IAC/BECa-147, IAC/BECa-152). Os tratamentos consistiram de: 1. inoculação, sem adubação nitrogenada; 2. inoculação + 200mg de N; 3. testemunha sem inoculação e sem adubação nitrogenada; 4. testemunha + 200mg de N. Os experimentos foram realizados como inteiramente ao acaso, com 5 repetições. Coletou-se solo da Fazenda Santa Elisa que foi seco, peneirado e analisado quanto à fertilidade. O solo recebeu correção da adubação, sendo que apenas o nitrogênio não foi corrigido, e distribuído em vasos de 5L. Plantas da variedade de cana-de-açúcar IAC95-5000 foram colhidas em campo para a coleta de gemas, que passaram por tratamento térmico e em seguida foram colocadas em copos contendo substrato esterilizado para germinação, recebendo a primeira dose de inóculo (2 mL). Para a preparação do inóculo os isolados foram crescidos em 15 ml de meio Dygs, por 2 dias e centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm; o sobrenadante foi descartado, o pelet ressuspendido em água deionizada esterilizada e a concentração do inóculo ajustada a 10^8 pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 450 nm. Após 10 dias, as plântulas de tamanho uniforme foram transplantadas para vasos contendo 5L de solo e submetidas a uma segunda inoculação. Desta vez os isolados foram crescidos em 30 ml de meio Dygs em tubos falcon de 50 ml, por 3 dias, e passaram pelo mesmo processo já descrito anteriormente. No transplante foram aplicados junto às raízes das plantas 10 mL do inóculo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por 4 meses sendo regadas com água deionizada. Foram analisadas quanto à massa de matéria seca da parte aérea e das raízes, número de perfilhos e atividade das enzimas redutase do nitrato (Reed et al., 1980) e sintetase da glutamina (Rhodes et al., 1975).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS POR ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DO DNA RIBOSSOMAL 16S.

Os isolados utilizados tiveram o gene rDNA16S sequenciados e as sequências comparadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para identificação (tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos isolados pelo sequenciamento do gene rDNA 16S e comparação de sequência no banco de dados GenBank.

Isolado	Descrição	Max score	Query cover	Ident	Accesso
IAC/BECa-090	<i>Pectobacterium sp.</i>	1844	99%	87%	FJ823047.1
IAC/BECa-095	<i>Kosakonia orizae</i>	2459	98%	98%	JQ726710.1
IAC/BECa-099	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2549	99%	99%	KF542909.1



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

IAC/BECa-133	<i>Enterobacter radicincitans</i>	2534	99%	99%	HF569043.1
IAC/BECa-137	<i>Kosakonia oryzae</i>	2503	99%	98%	JQ659764.1
IAC/BECa-144	<i>Kosakonia oryzae</i>	2473	99%	97%	EF488760.1
IAC/BECa-101	<i>Enterobacter asburiae</i>	2505	100%	98%	KF054941.1
IAC/BECa-112	<i>Enterobacter asburiae</i>	2490	99%	99%	KF054941.1
IAC/BECa-117	<i>Enterobacter asburiae</i>	2432	99%	99%	EU221358.1
IAC/BECa-128	<i>Citrobacter sp</i>	1218	99%	79%	EU365679.1
IAC/BECa-135	<i>Burkholderia tropica</i>	2409	99%	97%	HQ023262.1
IAC/BECa-140	<i>Kosakonia oryzae</i>	2479	99%	98%	JF513179.1
IAC/BECa-141	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2462	100%	98%	EF672049.1
IAC/BECa-146	<i>Enterobacter cloacae</i>	2538	100%	98%	FJ532062.1
IAC/BECa-147	<i>Kosakonia oryzae</i>	2516	99%	98%	HQ706110.1
IAC/BECa-152	<i>Kosakonia oryzae</i>	2488	98%	97%	EF488760.1

3.1 Promoção de crescimento

A inoculação dos isolados bacterianos diferiu do tratamento controle (sem inoculação), quanto à massa de matéria seca da parte aérea e da raiz, mas não quanto ao número de perfilhos e atividade das enzimas (tabela 2).

Tabela 2. Massa de matéria seca da parte aérea (MMS-PA), massa de matéria seca da raiz (MMS-Raiz), número de perfilhos e atividades das enzimas redutase do nitrato (NR) e sintetase da glutamona (GS) em plantas de cana de açúcar tratadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas que apresentam o gene *nifH*.

ISOLADO	MMS - PA g	MMS - Raiz g	n. perfilhos	Atividade NR mmoles de NaNO ₂ g ⁻¹	Atividade GS mmoles de GGH g ⁻¹
Controle	11,006 c*	9,124 b*	2,4 a*	0,104 a*	0,120 a*
IAC/BECa 90	18,302 a	21,316 a	2,6 a	0,072 a	0,120 a
IAC/BECa 95	19,156 a	23,218 a	2,8 a	0,116 a	0,120 a
IAC/BECa 99	18,236 a	22,670 a	2,8 a	0,104 a	0,120 a
IAC/BECa 133	18,382 a	22,552 a	2,8 a	0,106 a	0,118 a
IAC/BECa 137	17,150 b	22,310 a	3,4 a	0,102 a	0,116 a
IAC/BECa 144	16,980 b	21,652 a	2,6 a	0,084 a	0,120 a

* letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%

A inoculação de isolados de bactérias endofíticas não aptos à realização da FBN (ausência do gene *nifH*) aumentou a produção de matéria seca da parte aérea e de raiz das plantas de cana em relação ao controle, principalmente com a adição de N ao solo (Tabela 3). O número de perfilhos das plantas que receberam inóculo bacteriano não diferiu significativamente das plantas controle, mas, para a maioria dos isolados, as plantas que receberam N mostraram maior perfilhamento.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Tabela 3 . Massa de matéria seca da parte aérea (MMS-PA), massa de matéria seca da raiz (MMS-Raiz) e número de perfilhos de plantas de cana de açúcar tratadas com diferentes isolados de bactérias endofíticas, com e sem adição de nitrogênio.

Isolado/adubação	Com N	Sem N	Com N	Sem N	Com N	Sem N
	_____MMS PA, g_____		_____MMS Raiz, g_____		_____No. Perfilhos_____	
Controle	17,5 bA	11,0 aA	11,0 bA	9,1 aA	3,2 aA	2,4 aA
IAC/BECa 101	38,2 aA	19,3 aB	29,5 aA	20,1 aA	6,6 aA	2,6 aB
IAC/BECa 112	39,7 aA	18,0 aB	30,8 aA	16,9 aB	6,2 aA	3,0 aB
IAC/BECa 117	38,9 aA	19,2 aB	29,0 aA	25,1 aA	6,2 aA	2,0 aB
IAC/BECa 128	36,8 aA	19,6 aB	30,6 aA	19,5 aB	5,8 aA	2,6 aB
IAC/BECa 135	36,1 aA	17,9 aB	26,7 aA	20,9 aA	4,6 aA	3,2 aA
IAC/BECa 140	36,2 aA	18,6 aB	28,0 aA	18,8 aA	7,2 aA	4,0 aB
IAC/BECa 141	36,5 aA	19,0 aB	26,8 aA	19,2 aA	5,8 aA	2,8 aB
IAC/BECa 146	37,4 aA	16,4 aB	30,2 aA	19,6 aB	6,0 aA	2,4 aB
IAC/BECa 147	33,6 aA	19,4 aB	26,4 aA	20,7 aA	7,2 aA	3,0 aB
IAC/BECa 152	36,7 aA	17,7 aB	30,2 aA	21,3 aA	6,8 aA	3,8 aA

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%: minúscula compara entre isolados e maiúscula, entre dose de N.

A associação com bactérias endofíticas promove incremento na produção de matéria seca da parte aérea e de raízes de plantas de cana de açúcar (Oliveira et al., 2003; Govindarajan et al., 2006; Reis Jr. et al., 2008). Esses resultados obtidos empregando-se gemas para obtenção das plantas são semelhantes aos observados por Freitas (2011), que utilizou os mesmos isolados em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.

As enzimas redutase do nitrato e sintetase da glutamina estão relacionadas à redução assimilatória do $N-NO_3$ e o aumento na atividade dessas enzimas já foi observado em cana associada a essas bactérias, mesmo em condições de baixas concentrações de nitrogênio (Donato et al., 2004), o que não foi observado nos experimentos realizados. O efeito benéfico do uso



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

desses microrganismos não está associado apenas à fixação biológica do nitrogênio, mas também a outros mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da planta, como produção de fitohormônios, aumento na eficiência nutricional por alteração do metabolismo e fisiologia da planta.

4 CONCLUSÃO

Os isolados de bactérias endofíticas, com capacidade ou não de fixar N_2 (presença do gene *nifH*) mostraram-se promissores na promoção de crescimento de plantas de cana de açúcar a partir de gemas, incrementando a biomassa vegetal.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. Ao Instituto Agrônomo (IAC) - Centro de Solos e Recursos Ambientais, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L, *Biology and Fertility of Soils*, v.35, n.4, p.231-237, 2002.

BARBOSA, E.A.; PERIN, L.; REIS, V.M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. V.41, n.5, p. 827-833, Brasília, Mai. 2006.

BRASIL, M.; S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 29, p. 179-190, 2005

CARVALHO, A.V.; ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Resposta do dendezeiro à adição de nitrogênio e sua influência na população de bactérias diazotróficas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. V.41, n.2, p. 293-300, Brasília, fev. 2006.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; DOUZA, E.S.; FRANÇA, J.G.E.; MACIEL, G.A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.11, p.1087-1093, 2004.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

FERNANDES, A. O. Bactérias endofíticas e fungo micorrízico arbuscular na produção de mudas cítricas. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical. Área de concentração: Gestão de Recursos Agroambientais – Microbiologia do Solo), Instituto Agrônomo – IAC. Campinas – SP, 2012.

FREITAS, R.P. Bactérias diazotróficas endofíticas associadas à cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical. Área de concentração: Gestão de Recursos Agroambientais – Microbiologia do Solo), Instituto Agrônomo – IAC. Campinas – SP, 2011.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil*, v.280, n.1-2, p.239-252, 2006

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.44, p.59-61, 2003

REED, A.J.; BELOW, F.E.; HAGEMAN, R.H. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and proteases activities during grain development in maize. *Plant Physiology*, v.66, p.1179-1183, 1980.

REIS JUNIOR, F. B; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v.32, p.1139-1146, 2008.

RHODES, D.; RENDON, G.A.; STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta*, New York, v.125, p.201-211, 1975.