



Desenvolvimento inicial das plantas de milho em resposta à inoculação com bactérias diazotróficas isoladas de *Epidendrum secundum*⁽¹⁾.

Gracielle Vidal Silva Andrade⁽²⁾; **Jorge Avelino Rodríguez Lozada**⁽³⁾; **Gabriele Mayra Alves de Azevedo**⁽⁴⁾; **Matheus Pereira Simões**⁽⁵⁾; **Marihus Altoé Baldotto**⁽⁵⁾; **Lílian Estrela Borges Baldotto**⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPq, FAPEMIG e FUNARBE.

⁽²⁾ Estudante, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, gracielle.andrade@ufv.br; ⁽³⁾ Estudante de Mestrado, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG; ⁽⁴⁾ Estudante, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG; ⁽⁵⁾ Engenheiro agrônomo formado, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG; ⁽⁶⁾ Professor (a), *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG.

RESUMO: Bactérias diazotróficas endofíticas, podem contribuir para o desenvolvimento de plantas hospedeiras através da fixação de N₂ e produção de substâncias reguladora de crescimento vegetal com menor ônus econômico e ambiental. Dentro desse contexto, o trabalho objetivou avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas isoladas de folhas e raízes de *Epidendrum secundum* no desenvolvimento inicial de plantas de milho variedade AG 1051 via tratamento de sementes. O experimento consistiu de 13 tratamentos (12 estirpes bacterianas e um controle sem inoculação), conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e tendo como unidade experimental um vaso contendo duas plantas de milho. Aos 35 dias, foram mensuradas as variáveis: altura da planta, número de folhas, diâmetro do caule, matéria fresca e seca da raiz e parte aérea. Resultados positivos foram observados com a inoculação da estirpe UFV 32221 com incremento de 1,91 g, que representa 53% frente ao controle na matéria fresca total. E um aumento de 0,22 g, com 81% diante do tratamento controle decorrente da inoculação da estirpe UFV 32121 na matéria seca da raiz. Conclui-se que as bactérias diazotróficas isoladas de *Epidendrum secundum* possuem potencialidade para formulação de inoculantes e/ou biofertilizantes para serem utilizados na cultura do milho.

Termos de indexação: *Zea mays*; fixação biológica de nitrogênio; bactérias promotoras de crescimento de plantas.

INTRODUÇÃO

A busca por métodos sustentáveis que incremente a produtividade agrícola com menores custos de produção e reduza os impactos ambientais tem incentivado estudos com a utilização de bactérias diazotróficas (Baldotto et al., 2010).

Bactérias diazotróficas são capazes de fixar o N₂ atmosférico e algumas plantas específicas podem formar associações com essas bactérias e obter o N por meio da fixação biológica e/ou obter substâncias promotoras de crescimento de plantas conforme já descrito para diversas culturas, como arroz (Verma et al, 2001), soja (Cattelan et al., 1999; Kuklinsky-Sobral et al., 2004) e milho (Chabot et al., 1998).

Estudos tem demonstrado que a resposta positiva quanto à inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP), pode ser atribuída a outros fatores além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), tais como a solubilização de fosfatos (Chabot et al., 1998), síntese de sideróforos (Lacava et al., 2008), biossíntese de fito-hormônios (Lucangeli & Bottini, 1997), controle biológico (Byrne et al., 2005) e indução de resistência sistêmica a patógenos na planta hospedeira (Kloepper et al., 1999). As BPCP pela FBN são capazes de aumentar cerca de duas vezes mais N no sistema solo-planta contribuindo com a utilização dos recursos biológicos do solo e do potencial genético das plantas do que a fertilização mineral (Moreira & Siqueira, 2002).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho inicial da variedade de milho AG 1051 em resposta à inoculação de estirpes bacterianas diazotróficas isoladas de folhas e raízes de *Epidendrum secundum*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Setor de Floricultura pertencente à Universidade Federal de Viçosa *Campus* Florestal (UFV-CAF).

Seleção de bactérias diazotróficas em plantas de milho

Foram utilizadas neste estudo 12 estirpes isoladas de folhas e raízes de *Epidendrum secundum*, essas bactérias são provenientes da



colecção de bactérias diazotróficas da UFV-CAF. O ensaio de seleção bacteriana consistiu de 13 tratamentos, sendo 12 isolados bacterianos e um controle (sem inoculação), conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e a unidade experimental foi um vaso contendo duas plantas de milho, totalizando assim 78 unidades experimentais.

Para a preparação do pre-inóculo, as bactérias foram crescidas em 5 mL de meio DYGS líquido por 24 h, a 30 °C e 120 rpm e transferidas para placas de Petri contendo 5 mL dos meios de culturas correspondes de cada bactéria usados no seu isolamento, sendo eles: JMV, JMV_L, NF_b, JNF_b, LGI e LGI-P (Baldani et al., 1992) e permaneceram em estufa bacteriológica a 30 °C por 7 dias. Em seguida, o inóculo foi vertido em frascos de erlenmeyer contendo 50 mL de meio DYGS e permaneceram por 24h, sob agitação de 120 rpm, a 30°C, para obtenção do inóculo. A inoculação foi realizada no erlenmeyer pela imersão das sementes de milho. Cada tratamento ficou imerso no meio bacteriano por 2 horas. O controle foi imerso em meio líquido DYGS autoclavado. Posteriormente, as sementes foram transferidas para vasos de plástico de 0,7 dm³. O substrato usado apresentava: pH 4,1; P 6,8, K 78 mg/dm³; Ca 0,6, Mg 0,3, Al 1,4, H+Al 7,59, SB 1,10, CTC_(t) 2,50, CTC_(T) 8,69 cmolc /dm³; V 13, m 56 %. O experimento foi conduzido em casa de vegetação.

Análise de crescimento

Aos 35 dias após plantio, as plantas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: altura da planta (ALT); número de folhas (NF); diâmetro do caule (DC); matéria fresca da raiz (MFR); matéria fresca da parte aérea (MFPA); matéria fresca total (MFT); matéria seca da raiz (MSR); matéria seca da parte aérea (MSPA); matéria seca total (MST), obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar a 65 °C por 72 horas e posterior pesagem em balança de precisão.

Análise estatística

Os resultados provenientes das avaliações foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar alterações com inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial das plantas de milho variedade AG 1051 em todas as variáveis e estatisticamente significativo para as variáveis DC, NF MFR, MFT e MSR (**Tabela 1**).

Para a variável MFT houve resultado significativo com a inoculação do isolado UFV 32221 que proporcionou um aumento de 53% e 1,91 g em relação ao controle. Resultados semelhantes foram observados por Perin et al. (2003), ao encontrar incrementos entre 2 a 28% na MFT em plantas de milho após utilizar bactérias das espécies *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*. A cultura teste utilizada foi o milho forrageiro híbrido duplo AG 1051 da Agrocere desenvolvido visando à produção de milho verde e silagem e um incremento na matéria fresca por BPCP pode se tornar uma alternativa viável, econômica e rentável destinado principalmente à alimentação animal (Matte, 2014).

Ao se analisar os resultados para MST, verificou-se que não houve efeito significativo assim como obteve para MFT, porém, o uso da mesma estirpe UFV 32221 foi possível detectar de forma prática um acréscimo de 47% em comparação ao controle. A ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas demonstrando especificidade da interação planta e bactéria diazotróficas como observado por Reis et al. (2000). Além disso, um aumento em torno de 20%, atribuídos à presença de bactérias diazotróficas endofíticas, podem ser considerados comercialmente significativos na agricultura (Bashand & Levanony, 1990).

Os resultados evidenciaram efeito significativo para MSR com incremento de 81% com o uso do isolado UFV 32121 comparado ao controle.

Reis Junior et al. (2008), ao realizarem experimento de inoculação com BPC *Azospirillum amazonense* em milho destacaram um incremento de 42% de raízes em relação ao tratamento não inoculado. Pode-se sugerir que o aumento radicular seja devido à produção de substâncias promotoras de crescimento durante o desenvolvimento inicial das plantas de milho dada pela disponibilidade de fontes de carbono fornecida através da exsudação radicular aumentando a capacidade de absorção do nitrogênio (Bredemier & Mundstock, 2000).

Resultados diferentes foram encontrados para as variáveis MFPA e MSPA com a inoculação do isolado UFV 32521 que apesar de não diferir estatisticamente do controle, de modo geral, observou-se um incremento de 68 % e 53% e um acréscimo de 1,39 g e 0,17 g respectivamente. De forma similar aos resultados obtidos por Dartora et al. (2013) que embora sem diferir estatisticamente da testemunha a inoculação combinada das estirpes *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* proporcionou incremento de 12 % na parte aérea relação à testemunha. Relatos sobre bactérias diazotróficas colonizando a parte aérea das plantas



são menos frequentes. No entanto, Quadros et al. (2014) estudando a variedade SH5050 de milho relatou após a inoculação de *Azospirillum* incrementos significativos na parte aérea.

CONCLUSÕES

1. Bactérias diazotróficas isoladas de *Epidendrum secundum* promovem o crescimento inicial de plantas milho.
2. Os isolados UFV 32221 e UFV 32121 podem ser utilizados na formulação de inoculantes para incrementar eficiência no acúmulo da matéria fresca e/ou matéria seca radicular em plantas de milho.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ 03929-10), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 470567/2011-2) e à Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) pelos auxílios financeiros.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam o N₂ atmosférico*. Comunicado Técnico, Embrapa Agrobiologia, n.12, 1996. 4p.
- BALDOTTO, L.; BALDOTTO, M.; OLIVARES, L.; VIANA, P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.34, p.349-360, 2010.
- BASHAND, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal Microbiology*, v. 36, n.9, p.591-608, 1990.
- BREDEMEIR, C.; MUNDSTOCK, C., M., Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciênc. Rur.*, Santa Maria, v.30, p.365-372, 2000.
- BYRNE, J.M.; DIANESE, A.C.; JI, P.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; LOUWS, F.J.; MILLER, S.A.; JONES, J.B. & WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biol. Control*, 32:408-418, 2005.
- CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G. & FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63:1670-1680, 1999.
- CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C.J.; KLOPPER, J.W. & ANTOUN, H. Effect of phosphorous on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil Biol. Biochem.*, 30:1615-1618, 1998.
- DARTORA, J.; GUIMARÃES, V.F.; MARTINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.17, n.10, p.1023-1029, 2013.
- KLOPPER, J.W.; RODRIGUEZ-UBANA, R.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E. & FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Austr. Plant Pathol.*, 28:21-26, 1999.
- KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.*, 6:1244-1251, 2004.
- LACAVA, P.T.; SILVA-STENICO, M.E.; ARAÚJO, W.L.; SIMIONATO, A.V.C.; CARRILHO, E.; TSAI, S.M. & AZEVEDO, J.L. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43:521-528, 2008.
- LUCANGELI, C. & BOTTINI, R. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Symbiosis*, 23:63-72, 1997.
- MATTE, L. Adição de inoculante com *Azospirillum brasilense* combinado com níveis de nitrogênio na cultura de milho para silagem. Descalvado: Universidade Camilo Castelo Branco, 2014. 47p. (Dissertação de Mestrado).
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do solo*. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626p.
- PERIN, L.; SILVA, M.; FERREIRA, S.; CANUTO, L.; MEDEIROS, A.; OLIVARES, L.; REIS, M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. *Agronomia*, v.37, p.47-53, 2003.
- QUADROS, D.; ROESCH, W.; SILVA, D.; VIEIRA, M.; ROEHRS, D.; CAMARGO, O. Field agronomic performance of maize hybrids inoculated with *Azospirillum*. *Revista Ceres*, v.61, p. 209-218, 2014.
- REIS, M.; BALDANI, I.; BALDANI, D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and Palm trees. *Critical Reviews in Plant Science*, v.19, p.227-247, 2000.



Tabela 1. Características de crescimento de *Zea mays* em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas isoladas de *Epidendrum secundum*

Tratamento ¹	Características de Crescimento ²											
	ALT	DC	NF	MFPA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST			
	cm	mm	unidade	-----g-----								
Controle	45,10 a	3,50 b	4,00 b	2,05 a	1,57 abcde	3,63 bcde	0,32 a	0,27 b	0,59 a			
UFV 31131	44,80 a	3,80 ab	4,00 b	2,84 a	1,80 abcd	4,60 abc	0,40 a	0,32 ab	0,71 a			
UFV 32121	39,82 a	4,04 ab	4,00 b	2,72 a	1,89 abc	4,62 abc	0,39 a	0,49 a	0,76 a			
UFV 31231	42,49 a	4,34 a	4,00 b	2,81 a	2,10 ab	4,91 ab	0,39 a	0,36 ab	0,75 a			
UFV 32221	42,65 a	4,52 a	4,33 a	3,29 a	2,24 a	5,54 a	0,42 a	0,44 ab	0,87 a			
UFV 31321	41,13 a	4,12 ab	4,00 b	3,12 a	1,31 bcdef	4,44 abcd	0,43 a	0,38 ab	0,81 a			
UFV 32321	40,89 a	4,20 ab	4,00 b	2,25 a	0,72 f	2,97 de	0,32 a	0,25 b	0,58 a			
UFV 31431	45,68 a	4,23 ab	4,00 b	2,70 a	1,04 def	3,74 bcde	0,40 a	0,29 ab	0,68 a			
UFV 32421	41,33 a	3,97 ab	4,00 b	2,69 a	1,20 cdef	3,89 bcde	0,39 a	0,34 ab	0,74 a			
UFV 31531	44,85 a	3,91 ab	4,00 b	3,29 a	0,96 ef	4,26 abcde	0,48 a	0,33 ab	0,82 a			
UFV 32521	42,13 a	3,96 ab	4,00 b	3,44 a	1,01 def	4,46 abcd	0,49 a	0,26 b	0,75 a			
UFV 31631	44,00 a	4,32 a	4,00 b	2,55 a	0,59 f	3,15 cde	0,37 a	0,32 ab	0,69 a			
UFV 32621	41,59 a	4,02 ab	4,00 b	2,14 a	0,62 f	2,76 e	0,32 a	0,33 ab	0,65 a			
QMR	12,082	0,140	0,016	0,700	0,180	0,950	0,014	0,009	0,031			
CV (%)	7,91	8,54	2,88	27,27	27,02	18,51	28,55	24,31	21,74			

¹Tratamento: Identificação dos isolados bacterianos: UFV seguido dos números que indicam a espécie vegetal (1: *Epidendrum secundum*); tecido vegetal (1: raiz, 2: folha); meio de cultura (1: JMV, 2: JMV L, 3: NFB, 4: JNFb, 5: LGI); diluição; número de ordem do isolado na coleção. ²Características de crescimento: ALT, altura da planta; DC, diâmetro do caule; NF, número de folhas; MFPA, matéria fresca da parte aérea; MFR, matéria fresca da raiz; MFT, matéria fresca total da planta; MSPA, matéria seca da parte aérea; MSR, matéria seca da raiz; MST, matéria seca total da planta.