



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016 www.pocos.com.br

INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SEMENTES DE ALFACE

Anderson Romão dos Santos⁽¹⁾; Edevaldo Rene Tranches⁽¹⁾; José Antônio Lima⁽¹⁾; Ligiane Aparecida Florentino⁽²⁾; Paulo Roberto Corrêa Landgraf⁽²⁾; Guilherme Moreira Leite⁽¹⁾; Leticia Machado Góes⁽¹⁾

(1) Estudante de graduação em Agronomia da Universidade José do Rosário Vellano-UNIFENAS, campos Alfenas-MG.

(2) Professor do Departamento de Agronomia da Universidade José do Rosário Vellano-UNIFENAS, campos Alfenas-MG.

Eixo temático: Conservação Ambiental e Produção Agrícola Sustentável.

RESUMO – O trabalho teve como objetivo avaliar a influência da inoculação com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas e produtoras de ácido 3-indol acético (AIA) na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Os tratamentos foram constituídos pela inoculação de seis estirpes bacterianas pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UNIFENAS: UNIFENAS 100-94, UNIFENAS 100-150, UNIFENAS 100-153, UNIFENAS 100-167, UNIFENAS 100-185, UNIFENAS 100-198 e Ab-V5, espécie *Azospirillum brasilense*. Estas estirpes foram cultivadas em meio NFb, com e sem a presença do aminoácido triptofano (precursor da síntese de AIA). Foi utilizado ainda um tratamento controle, sem inoculação. O experimento foi realizado em Gerbox, contendo papel filtro e 8mL de água destilada esterilizada. Foram utilizadas três repetições e em cada gerbox foram utilizadas 20 sementes, sobre as quais foram inoculadas 2mL da suspensão bacteriana. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 7x2+1. Após sete dias foram analisadas a taxa de germinação e o Comprimento radicular. Na inoculação em sementes, as estirpes bacterianas UNIFENAS 100-94, UNIFENAS 100-150, UNIFENAS 100-153, UNIFENAS 100-167 e UNIFENAS 100-198 obtiveram melhor resultado sobre a taxa de Germinação. No Comprimento das raízes, as estirpes UNIFENAS 100-150, UNIFENAS 100-153 e UNIFENAS 100-198 foram as que obtiveram melhor atuação. Sendo todas as estirpes bacterianas utilizadas indicadas para posteriores testes de produção hormonal em plantas de Alface.

Palavras-chave: Inoculação. Bactérias diazotróficas. Triptofano. Alface.

Abstract – The study aimed to evaluate the influence of inoculation with different strains of diazotrophs and acid producing 3-indole acetic acid (IAA) on lettuce seed germination (*Lactuca sativa* L.). The treatments were constituted by inoculating six bacterial strains from the collection of Agricultural Microbiology Laboratory of UNIFENAS: UNIFENAS 100-94, 100-150 UNIFENAS, UNIFENAS 100-153, 100-167 UNIFENAS, UNIFENAS 100-185, 100-198 UNIFENAS and Ab-V5, species *Azospirillum brasilense*. These strains were cultured in NFb with and without the presence of the amino acid tryptophan (a precursor of IAA synthesis). It was also used a control treatment without inoculation. The experiment was conducted in Gerbox containing filter paper and sterilized distilled water to 8 mL. Three replicates were used and in each gerbox 20 seeds were used, which were inoculated on 2 ml of bacterial suspension. The design was completely randomized in a factorial



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE**

de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016 www.pocos.com.br

scheme $7 \times 2 + 1$. After seven days were analyzed germination rate and root length. In inoculation of seeds, bacterial strains UNIFENAS 100-94, UNIFENAS 100-150, 100-153 UNIFENAS, UNIFENAS 100-167 and 100-198 UNIFENAS obtained better results on the germination rate. In the length of the roots, strains UNIFENAS 100-150, 100-153 and UNIFENAS UNIFENAS 100-198 were the ones that had better performance. Since all the bacterial strains used for further indicated hormone production tests on lettuce plants.

Keywords: Inoculation. Bacteria diazotrophic. Tryptophan. Lettuce.

Introdução

As bactérias diazotróficas são microorganismos capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3). Estas podem ser encontradas livres no solo, associadas a espécies vegetais, tanto na rizosfera quanto endofiticamente, como verificado em muitas plantas da família Poacea, como arroz, milho e cana-de-açúcar e em simbiose com diversas espécies de leguminosas.

Além de fixar o nitrogênio atmosférico, estas bactérias são capazes de solubilizar fosfato, produzir hormônios vegetais, atuar como antagônicas a espécies patogênicas, além de influenciar o metabolismo nitrogenado da planta, sendo considerada como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas-RPCP. Dentre os hormônios vegetais produzidos pelas RPCP, destaca-se a auxina. Esta é produzida a partir da reação entre fenóis em oxidação e o aminoácido triptofano.

As bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser agrupadas em três categorias: organismos de rizosfera, que inclui todas as espécies que colonizam a superfície radicular, tais como, *Azotobacter paspali* e *Beijerinckia* spp.; endofíticos facultativos, todas as bactérias diazotróficas que podem colonizar a superfície e interior das raízes, representadas basicamente pelas espécies de *Azospirillum*, exceto *A. halopraeferens*; e endofíticos obrigatórios, constituído, principalmente, pelas espécies isoladas mais recentemente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Azoarcus*, que são capazes de colonizar o interior das raízes e tecidos aéreos das plantas (BALDANI, 1997).

Os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico) são substâncias que desempenham funções na regulação do crescimento em plantas. A principal auxina de ocorrência natural é denominada de AIA. Diversos micro-organismos, como bactérias e fungos no solo, associados às plantas, sintetizam hormônios de crescimento iguais aos encontrados nas plantas, dentre eles o AIA.

O aminoácido triptofano é comum em plantas como constituinte de proteínas e precursor intermediário da biossíntese de várias substâncias indólicas, entre elas o ácido indolacético (HAGGQUIST et al., 1988). Segundo Gordon & Paleg (1961), os fenóis, em condição de oxidação, reagem com o triptofano para formar a auxina. As auxinas estão entre as substâncias de crescimento vegetal produzidas por *Azospirillum* e outros gêneros, das quais o ácido indolacético (AIA) é a mais ativa e melhor caracterizada (CROZIER et al., 1988). O ácido indolacético é conhecido por produzir tanto respostas rápidas (aumento da alongação celular) como lentas



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE**

de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016 www.pocos.com.br

(divisão e diferenciação celular) (DOBBELAERE et al., 2003).

O presente trabalho tem como objetivo verificar a influência da inoculação com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas promotoras do crescimento vegetal (BPCV) em alface no estágio de germinação.

Material e Métodos

Local do experimento

O experimento foi conduzido em Laboratório de Microbiologia Agrícola, na Faculdade de Agronomia da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas), Campus Alfenas – MG.

Estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal

Para o experimento em Gerbox foram utilizadas seis estirpes bacterianas pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UNIFENAS: UNIFENAS 100-94, UNIFENAS 100-150, UNIFENAS 100-153, UNIFENAS 100-167, UNIFENAS 100-185, UNIFENAS 100-198, e inoculação com a estirpe Ab-V5, da espécie *Azospirillum brasilense* as quais foram cultivadas em meio NFb (Dobereiner et al., 1995) com e sem a presença do aminoácido triptofano. As estirpes pertencentes à coleção da UNIFENAS foram selecionadas devido à capacidade de produzir AIA *in vitro* (Dias, 2015). A estirpe Ab-V5 foi cedida pela Embrapa Agrobiologia e nesse trabalho foi utilizada devido à sua comprovada capacidade em produzir AIA (Moreira et al., 2010).

Para inoculação nas sementes de alface, estas estirpes foram cultivadas em meio NFb (Dobereiner et al., 1995) até a fase logarítmica de crescimento, contendo aproximadamente 10^8 células mL⁻¹.

Inoculação em sementes de Alface

Em todos os testes foram utilizados aquênios do mesmo lote de alface (*Lactuca sativa L.*) cv. Regina (TOPSEED), adquiridos no comércio local.

Os biotestes foram realizados segundo Rodríguez et al. (2006), com modificações. As sementes de alface foram previamente desinfestadas em álcool 98,2°, hipoclorito de sódio 2% e água destilada esterilizada por 1 minuto. Foram utilizadas 20 sementes por gerbox, os quais continham papel de germteste e umedecidas com 8 ml de água destilada esterilizada. Para inoculação foi utilizado 2,0 ml da suspensão bacteriana.

Os bioensaios foram conduzidos em temperatura média de 25 °C por 7 dias onde foram realizadas as observações e os cálculos de % de germinação e comprimento das raízes.

Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema Fatorial 7x2+1. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de significância pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000).



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE**

de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016 www.pocos.com.br

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão apresentados dados referentes as médias obtidas quanto a % de taxa de germinação das sementes. É possível observar ainda que o cultivo das estirpes bacterianas em meio contendo triptofano não influenciou neste parâmetro.

Tabela 1. Taxa de Germinação (%) de sementes de Alface.

TRATAMENTO	GERMINAÇÃO (%)
UNIFENAS 100-94	95,00 a
UNIFENAS 100-150	94,17 a
UNIFENAS 100-153	96,60 a
UNIFENAS 100-167	94,16 a
UNIFENAS 100-185	82,50 b
UNIFENAS 100-198	90,83 a
Ab-V5 - <i>Azospirillum brasilense</i>	88,33 b
CONTROLE*	88,33 b

¹Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. *Tratamento adicional, sem inoculação com estirpes bacterianas.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a inoculação com todas as estirpes da coleção UNIFENAS, exceto a estirpe UNIFENAS 100-185, proporcionaram maior aumento na taxa de germinação das sementes de alface. O aumento da germinação de sementes inoculadas com rizóbios produtores de AIA foram relatados por Vargas et al. (2009) e Osório Filho (2009), sendo esse fator importante no estabelecimento da cultura.

A taxa de germinação das sementes inoculadas com a estirpe Ab-V5 não diferiu do controle sem inoculação, diferindo dos resultados obtidos por outros autores, conforme relatado na revisão de Moreira et al (2010).

Na Tabela 2 as médias referentes ao comprimento das raízes de alface quando inoculadas com as diferentes estirpes de bactérias diazotróficas.

Tabela 2. Comprimento das raízes (cm) de plântulas de alface, inoculadas com diferentes estirpes bacterianas.

TRATAMENTO	COMPRIMENTO RADICULAR (cm)
	TRIPTOFANO



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016 www.pocos.com.br

	COM	SEM
UNIFENAS 100-94	3,71 Aa	3,46 Aa
UNIFENAS 100-150	3,11 Ab	3,88 Aa
UNIFENAS 100-153	3,97 Aa	4,46 Aa
UNIFENAS 100-167	1,31 Bb	3,62 Aa
UNIFENAS 100-185	0,65 Bb	2,67 Ba
UNIFENAS 100-198	1,72 Bb	3,63 Aa
<i>Azospirillum brasilense</i>	1,13 Bb	3,46 Aa
CONTROLE*	3,62 A	

¹Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. * Tratamento adicional, sem inoculação com estirpes bacterianas.

Quanto ao crescimento radicular obteve-se diferença entre as bactérias promotoras de crescimento quando inoculadas com e sem o triptofano. Os isolados UNIFENAS 100-94 e UNIFENAS 100-153 foram as que obtiveram melhores resultados na presença do triptofano, podendo estar relacionada ao fato deste aminoácido ser um dos precursores mais conhecidos para as vias de biossíntese de AIA em bactérias, apesar da existência de outras vias, cujo precursor ainda é desconhecido (Spaepen et al., 2007).

As outras bactérias quando inoculadas com o triptofano obtiveram um resultado negativo, isso pode estar de acordo com as conclusões chegadas por Ramaih et. al.(2003) em trabalho feito com sementes de trigo, apenas a presença de triptofano pode afetar a germinação bem como desenvolvimento de plântulas e crescimento radicular de determinadas plantas. Visto que na maioria a utilização do triptofano não obteve grande sucesso, em apenas um tratamento, UNIFENAS 100-94, obteve-se número maior em relação ao comprimento de raízes sem o triptofano.

O *Azospirillum brasilense*, segundo Cassán et al. (2009) pode promover incrementos na biomassa de plântulas durante o estágio inicial de desenvolvimento, o que se deve em parte ao desenvolvimento diferencial do embrião induzido pelos reguladores de crescimento produzidos pela bactéria que penetram no tegumento da semente junto com a água, acelerando o crescimento da radícula e potencializando sua capacidade de absorção. O que de fato aconteceu, porém o tratamento com a presença de triptofano não foi obtido sucesso, sendo assim pode ter sido usada uma quantidade excessiva do aminoácido provocando essa alteração nas plântulas.

Conclusões

Conclui-se que a inoculação com estirpes de bactérias diazotróficas produtoras de AIA contribuíram para aumentar a taxa de germinação das sementes e o comprimento das raízes.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE**

de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2010 www.meioambiente.pocos.com.br

Referências Bibliográficas

BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. **Recent advances in BNF with non-legume plants**. Soil Biology and Biochemistry, v.29, p.911-922, 1997.

CASSÁN F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v.45, n.1, p.28-35, 2009.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, Embrapa-SPI. Itaguaí, Embrapa- CNPAB, 1995. 60p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In:Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria, 45. 2000a, São Carlos, **Programa e resumos**. São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology – with special reference to the microorganisms of the soil**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1928. 145p.

GORDON, S.A.; PALEG, L.G. Formation of auxin from tryptophan through action of polyphenols.**Plant Physiology**, v.36, p.838-845, 1961.

HAGGQUIST, M.L.; STRID, K.O.; WIDEL, L.; LILJENBERG, C. Identification of tryptophan in leachate oat hulls (*Avena sativa*) as mediator of root growth regulation.**Physiologia Plantarum**, v.72, p.423-427, 1988.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S.A.; CARVALHO, F. Diazotrophic associative bacteria: diversity, ecology and potential applications. **Comun. Sci.** 2010. 1(2):74-99.

OSORIO FILHO, B.D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2015 www.meioambiente.pocos.com.br

RAMAIIH, S.; GUEDIRA, M.; PAULSEN, G. M. Relationship of indoleacetic acid and tryptophan to dormancy and preharvest sprouting of wheat. **Functional Plant Biology**, Victoria, v.30, n.9, p.939-945, 2003.

RODRÍGUEZ, M. T. T. et al. Toxicidad aguda de lixiviados acuosos mediante un ensayo con *Lactuca sativa* L. *Higiene y Sanidad Ambiental*, Madrid, v. 6, n. 1, p. 170-172, 2006.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, v.31, p.425-448, 2007.

VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C.E.; GINONGO, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v.33, n.5, p.1227-1235, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v33n5/v33n5a16.pdf>>. Acesso em: 22 de junho de 2015.