

## **Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Cultivares de Milho em Áreas de Cerrado e Mata no Estado de Roraima**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*  
**Centro de Pesquisa Agroflorestal de Roraima**  
*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1981 - 6103  
Dezembro, 2010

## **Documentos 43**

# **Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Cultivares de Milho em Áreas de Cerrado e Mata no Estado de Roraima**

Maria de Lourdes Gomes

Liamara Perin

Gilmara Maria Duarte Pereira

Jerri Edson Zilli

\*Parte da dissertação do primeiro autor

Boa Vista, RR

2010

Exemplares desta publicação podem ser obtidos na:

**Embrapa Roraima**

Rod. BR 174 Km 08 - Distrito Industrial Boa Vista-RR

Caixa Postal 133. 69301-970 - Boa Vista - RR

**Telefax: (95) 4009 7100**

e-mail: [sac@cpafrr.embrapa.br](mailto:sac@cpafrr.embrapa.br)

[www.cpafr.embrapa.br](http://www.cpafr.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Marcelo Francia Arco-Verde

Secretário-Executivo: Everton Diel Souza

Membros: Alexandre Matthiensen

Antônio Carlos Centeno Cordeiro

Carolina Volkmer de Castilho

Edvan Alves Chagas

Helio Tonini

Kátia de Lima Nechet

Paulo Sérgio Ribeiro de Mattos

Normalização Bibliográfica: Jeana Garcia Beltrão Macieira

Editoração Eletrônica: Vera Lúcia Alvarenga Rosendo

Revisão Gramatical: Ilda Maria Sobral de Almeida e Luiz Edwilson Frazão

**1ª edição**

1ª impressão (2010): 300

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP  
Embrapa Roraima

Gomes, Maria de L.

Bactérias diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no estado de Roraima. / Maria de L. Gomes, Liamara Perin, Gilmara M. D. Pereira e Jerri Edson Zilli. - Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2010.

35p. (Documentos / Embrapa Roraima, 43).

1. Fixação biológica. 2. Fertilização nitrogenada. I. Perin, Liamara. II. Pereira, Gilmara M. D. III. Zilli, Jerri Edson. IV. Embrapa Roraima.

CDD: 633.18

## **Autores**

### **Maria de Lourdes Gomes**

Estudante do Programa de Pós-graduação em Agronomia; Universidade Federal de Roraima, Campus Cauamé. BR 174, km 12, Monte Cristo, CP 133. CEP 69301-970, Boa Vista (RR).

### **Liamara Perin**

Professora, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe - Campus Glória - Rodovia Rota do Sertão, s/n. CEP 49680-000, Nossa Senhora da Glória (SE). E-mail: liaperin@yahoo.com.br.

### **Gilmara Maria Duarte Pereira**

Pós-doutoranda da Universidade Federal de Roraima, Campus Paricarana, Avenida Capitão Enê Garcez, s/n, Bairro Aeroporto, CEP 69304-000, Boa Vista, RR. E-mail: gmdpereira@hotmail.com

### **Jerri Edson Zilli**

Pesquisador da Embrapa Roraima, BR 174 km 08, Distrito Industrial, Caixa Postal 133 CEP 69307-970 Boa Vista, RR. zilli@cpafrr.embrapa.br



## SUMÁRIO

I – Introdução.....	4
II - Materiais e Métodos .....	5
III – Resultados.....	12
IV – Conclusão .....	41
V – Referências bibliográficas .....	41

# Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Cultivares de Milho em Áreas de Cerrado e Mata no Estado de Roraima

---

Maria de Lourdes Gomes  
Liamara Perin  
Gilmara Maria Duarte Pereira  
Jerri Edson Zilli

Entre as atividades desempenhadas por microrganismos do solo, a fixação biológica de nitrogênio – FBN, talvez seja o processo microbiano relacionado à agricultura mais bem estudado e explorado tecnologicamente. Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações de fertilizantes nitrogenados tende a melhorar a qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para águas superficiais e subterrâneas e menor emissão de gases que contribuem com o efeito estufa (GALLOWAY et al., 2003). A maximização das contribuições da FBN nos agroecossistemas tornou-se, então, parte dos esforços de pesquisa visando a sustentabilidade da produção agrícola. A busca de bactérias diazotróficas endofíticas para aplicação na cultura do milho tem sido alvo da pesquisa nos anos mais recentes, revelando que esses microrganismos colonizam não só raízes, mas também colmos e folhas de gramíneas (ROESCH, 2007; QUADROS, 2009). Diversos estudos têm mostrado que bactérias diazotróficas eficientes podem contribuir significativamente para o desenvolvimento da cultura do milho (ZILLI et al., 2007; PERIN, 2007; ALVES, 2007).

Em um processo de seleção de bactérias eficientes na FBN, o isolamento, visando a constituição de uma coleção de microrganismos, com posterior estudo dos isolados obtidos, representa uma etapa crucial para o sucesso da pesquisa. Neste sentido, a investigação da ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas da família *Poaceae*, como o milho, cultivadas na região Amazônica recebe destaque tanto pela carência de estudos dessa natureza quanto pelo potencial que a região representa em termos de recursos genéticos.

Neste sentido, este estudo objetivou avaliar a densidade e diversidade de bactérias endofíticas em 4 cultivares de milho (variedade: BRS 4157 e BR 106; Híbridos: BRS 1010 e BRS 3030), em dois ambientes: cerrado e mata alterada em Roraima e estruturar uma coleção de bactérias diazotróficas endofíticas dos cultivares de milho estudados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **ENSAIO DE CAMPO E COLETA DE AMOSTRAS**

As amostragens foram realizadas em experimentos conduzidos no Campo Experimental Água Boa (CEAB) da Embrapa Roraima, município de Boa Vista, representativo de área de cerrado (N02° 15'00" e W60° 39'54") e, no Campo Experimental Confiança (CEC) da Embrapa Roraima, município do Cantá (N02° 39'48" e W60° 50' 15"), que compreende uma região de mata. No CEAB, o local do experimento compreendia uma área em segundo ano de cultivo, tendo sido cultivada com soja no primeiro ano, com textura de 870 g kg<sup>-1</sup> de areia, 120 g kg<sup>-1</sup> de argila e 10 g kg<sup>-1</sup> de silte, enquanto no CEC, compreendia uma área cultivada com culturas anuais diversas por mais de uma década, com textura 670 g kg<sup>-1</sup> de areia, 270 g kg<sup>-1</sup> de argila e 60 g kg<sup>-1</sup> de silte.

As cultivares de milho BRS 1010, BRS 3003, BRS 4157 (Sol da Manhã), e BR 106 foram semeadas em faixas de 4 m de largura por 30 m de comprimento. Para cada cultivar, empregou-se um tratamento com a aplicação de N-mineral na forma de uréia, 100 e 80 kg ha<sup>-1</sup>, no CEAB e CEC, respectivamente, tendo sido aplicado 50% no plantio e 50% aos 25 dias após a emergência das plantas e adubação de plantio e um controle apenas com a adubação de plantio. Esta adubação de plantio compreendeu a aplicação de 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de superfosfato simples, 90 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de cloreto de potássio aplicado 50% no plantio e 50% aos 30 dias após a emergência das plantas.

No CEAB, o plantio foi realizado diretamente sobre a vegetação espontânea dessecada com glyphosate na dosagem recomendada pelo fabricante,

enquanto no CEC o preparo da área foi realizado através de grade aradora seguida de niveladora.

Aos 45-50 dias após a emergência das plantas, no período do pendramento (Vt), uma coleta foi realizada para avaliação da presença de bactérias diazotróficas. Para este fim, amostras de plantas foram coletadas para cada cultivar e tratamento suplementado ou não com nitrogênio, sendo cada uma composta por três plantas localizadas a uma distância de 3-5 m entre si. Nesta coleta, as plantas foram removidas com o auxílio de uma pá reta e, imediatamente, transportadas em temperatura ambiente para o laboratório, seguindo-se o processamento em no máximo 12 horas da coleta.

A coleta de folhas para a avaliação de nutrientes foi realizada na folha indicadora, que é a 1ª folha oposta à inflorescência feminina, tendo sido coletadas 30 folhas por bloco (Malavolta et al., 2006). Para a análise de solo, coletou-se uma amostra composta, a 0-20 cm para cada cultivar de milho e tratamento suplementado ou não com nitrogênio, tendo sido 10 pontos para cada amostra ao longo dos 30 m da faixa de plantio. Estas análises foram realizadas no laboratório de solos da Universidade Federal de Viçosa, seguindo as metodologias descritas pela EMBRAPA (1997).

**Tabela 1** - Características químicas Analíticas Obtidas nas Análises de Solo.

Amostra Cultivar/ Tratamento	pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H +	MO	Zn	Fe	Mn	Cu	Precipitação (mm)				
													H <sub>2</sub> C	-mg dm <sup>-3</sup> -	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----	Dag kg <sup>-1</sup>	-----mg/dm <sup>3</sup> -----
CEAB/CERRADO																	
BRS 330 S/N	6,5	19,9	19	1,2	0,4	0,0	1,7	1,0	0,8	31,9	1,9	0,4					
BRS 330 C/N	5,2	33,2	13	1,6	0,1	0,1	1,3	0,9	0,9	36,4	1,5	0,4					
BRS 1010 S/N	5,4	2,6	15	0,7	0,3	0,0	2,4	0,8	0,4	30,5	1,7	0,2					
BRS 1010 C/N	6,8	17,1	14	2,5	0,2	0,0	1,1	0,9	0,9	19,9	2,6	0,4	441,2	355,6	626,0	121,6	124,8
BRS 106 S/N	6,5	18,6	23	0,8	0,3	0,0	1,6	0,9	0,6	28,8	1,2	0,2					
BRS 106 C/N	5,4	3,3	17	0,4	0,2	0,1	1,7	1,0	0,6	33,8	2,7	0,2					
BRS 4157 S/N	5,9	5,5	23	0,8	0,3	0,0	1,1	0,9	0,3	49,3	1,4	0,3					
BRS 4157 C/N	5,1	17,0	16	0,5	0,1	0,2	1,9	1,0	0,4	48,7	1,6	0,3					
CEC/MATA																	
BRS 330 S/N	5,6	9,2	51	1,7	0,9	0,0	3,8	2,8	2,0	86,1	5,8	0,3					
BRS 330 C/N	5,14	6,7	52	0,8	0,3	0,5	5,2	2,8	2,1	116,6	2,9	0,8					
BRS 1010 S/N	5,28	5,2	68	0,8	0,4	0,1	3,3	2,1	1,6	161,8	1,8	0,2					
BRS 1010 C/N	5,53	7,7	63	1,7	0,8	0,0	3,3	2,4	3,5	106,9	3,1	0,5	524,1	413,6	438,9	185,6	190,2
BRS 106 S/N	5,69	7,4	32	1,7	0,8	0,0	3,0	2,6	1,7	74,1	2,7	0,4					
BRS 106 C/N	5,46	4,2	45	1,1	0,5	0,0	3,5	2,3	1,6	75,3	2,2	0,3					
BRS 4157 S/N	5,57	7,6	71	1,6	0,8	0,0	4,1	3,2	3,2	65,6	6,2	0,3					
BRS 4157 C/N	5,38	7,7	43	1,1	0,5	0,1	3,8	2,3	1,9	85,1	4,2	0,3					

Obs.: pH em água, KCl e CaCl - Relação 1:2,5; P - Na - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich 1; CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; Ca - Mg - Al - Extrator: KCl - 1 mol L<sup>-1</sup>; H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup> - pH 7,0; V = Índice de Saturação de Bases; B - Extrator água quente; S - Extrator - Fosfato monocálcico em ácido acético; SB = Soma de Bases Trocáveis; Matéria Orgânica (MO) = C.Org x 1,724 - Walkley-Black.

**Tabela 2** - Resultados Analíticos das Análises Foliare de Plantas de Milho cultivadas em áreas de cerrado (CEAB) e mata (CEC) com (C/N) e sem (S/N) aplicação suplementar de nitrogênio.

Amostra Cultivar/ Tratamento	N	P	K	Zn	Co	Mc
	dag kg <sup>-1</sup>			mg kg <sup>-1</sup>		
CEAB/CERRADO						
BRS 330 S/N	1,5	0,4	1,5	15,5	5,5	3,7
BRS 330 C/N	2,0	0,3	1,2	12,7	1,3	0,5
BRS 1010 S/N	1,6	0,4	1,4	14,7	0,6	1,7
BRS 1010 C/N	2,0	0,2	1,5	13,0	0,5	0,0
BRS 106 S/N	1,6	0,3	1,5	12,2	0,5	2,4
BRS 106 C/N	2,5	0,3	1,1	14,9	0,2	0,1
BRS 4157 S/N	1,3	0,4	1,4	13,6	0,1	1,1
BRS 4157 C/N	2,3	0,3	1,4	13,5	0,2	0,5
CEC/MATA						
BRS 330 S/N	2,7	0,4	1,6	21,0	0,0	1,6
BRS 330 C/N	2,4	0,2	1,5	16,6	0,0	0,0
BRS 1010 S/N	2,0	0,4	1,8	20,3	0,0	0,0
BRS 1010 C/N	1,6	0,3	2,2	18,2	0,0	0,0
BRS 106 S/N	1,7	0,4	1,6	18,5	0,0	1,0
BRS 106 C/N	2,4	0,4	1,3	17,8	0,0	0,9
BRS 4157 S/N	1,4	0,4	1,9	14,0	0,0	0,1
BRS4157 C/N	1,7	0,4	1,5	11,6	0,0	0,3

## ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Plantas de milho foram seccionadas em raízes e colmos, sendo que os segmentos de colmos foram considerados a partir 10 cm de distância das raízes, e processadas para isolamento de colônias de bactérias endofíticas e posterior contagem. As raízes e os colmos de cada amostra composta foram lavados com água corrente abundantemente, fragmentados em partes menores e separadas em porções de 10 g. Estas amostras foram transferidas para um erlenmeyer, onde foi realizada a desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 5 minutos. Em seguida, as amostras,

foram lavadas três vezes com água deionizada estéril e trituradas em liquidificador com 90 mL de solução salina a 0,85% e, posteriormente o “caldo” permaneceu em repouso por uma hora.

Depois de trituradas e agitadas em solução salina, as amostras de raízes e colmos foram diluídas seriadamente até  $10^{-6}$ , acrescentando-se 100  $\mu$ L da solução original (diluição  $10^{-1}$ ) em tubos contendo 900  $\mu$ L de solução salina. Das amostras de parte aérea, foram plaqueadas as diluições  $10^{-2}$  (CEC) e  $10^{-4}$  (CEAB) e das amostras de raízes foram plaqueadas as diluições  $10^{-4}$  (CEC) e  $10^{-6}$  (CEAB). Para tal, uma alíquota de 100  $\mu$ L foi depositada em placas de Petri contendo o meio de cultura DYG'S sólido (Rodrigues Neto et al., 1986), com 2 repetições.

As placas foram incubadas, a 28 °C por um período de 10 dias na ausência de luz até a observação de colônias bacteriana isoladas. Findo este período contou-se o número de colônia por placa para estimar a população de bactérias endofíticas associadas ao milho.

### **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS COLÔNIAS**

Cada colônia com aspecto fenotípico diferente crescida nas placas de Petri foi considerada para fins de contagem como uma bactéria diferente. Cada uma destas colônias fenotipicamente diferentes recebeu uma numeração e foi repicada para uma nova placa de Petri contendo, o meio de cultura DYG'S sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986) - no caso de haver mais de uma colônia fenotipicamente igual, apenas um representante foi repicado. Após a repicagem as placas foram mantidas a 28 °C por dez dias na ausência de luz.

Quarenta e oito horas após a incubação foi realizada a 1ª leitura, visando constatar a presença ou ausência de crescimento bacteriano, após a leitura as placas retornaram a incubadora e foram observadas a cada 48 horas durante dez dias consecutivos. Depois desse período, a caracterização das colônias foi efetuada. Os parâmetros analisados para a caracterização foram: tempo de crescimento, tamanho, forma, elevação, bordas, brilho e aspecto da colônia e, cor, aspecto, elasticidade e tipo do muco (NEDER, 1992).

## ARMAZENAMENTO DOS ISOLADOS

Após a caracterização das colônias em meio de cultura DYG'S sólido, a massa celular foi retirada com alça microbiológica estéril e adicionada a tubos contendo 700 µL de meio de cultura DYG'S com 25% de glicerol. As amostras foram homogeneizadas em agitador para tubos e armazenadas em freezer a -20 °C.

## CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

Os isolados foram testados quanto à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em meio de cultura semi-sólido (DÖBEREINER et al., 1995) usando microtubos com capacidade de 1,5 mL, contendo 0,5 mL meio de cultura semi-sólido BMGM (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Os microtubos inoculados foram incubação por dez dias a 28 °C. Findo o período de incubação, a presença de bactérias diazotróficas microarofílicas nas amostras de raízes e colmos de milho foi verificada pela formação de película na superfície do meio de cultura.

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS EM MEIOS DE CULTURA SEMI SELETIVOS

Os isolados identificados como bactérias diazotróficas endofíticas foram repicados em duplicata, diretamente em placas de Petri contendo os meios de cultura semi seletivos LGI (Magalhães et al., 1983) semi seletivo para *Azospirillum amazonense*; NFb (3x) Döbereiner et al. (1995); (com 3x a concentração do corante), semi seletivo para *Herbaspirillum* spp., *A. brasiliense* e *A. lipoferum* que acumulam corante em suas colônias e JMV (Baldani et al., 1986) semi seletivo para *Burkholderia* spp. e mantidos a 28 °C por 10 dias, na ausência de luz, para o crescimento de colônias isoladas.

Também foram repicados as estirpes HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae*), CBAmC (*Azospirillum amazonense*), Ppe8 (*Burkholderia tropica*), M130 (*Burkholderia* sp.), Sp7

(*Azospirillum brasilense*) como padrões de comparação. Após os 10 dias foram realizadas as caracterizações fenotípicas considerando o tempo de crescimento, tamanho, forma, elevação, bordas, brilho e aspecto da colônia e, cor, aspecto, elasticidade e tipo do muco (NEDER, 1992).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da estimativa da frequência de bactérias diazotróficas nos tecidos das plantas de milho, bem como o número de bactérias diazotróficas obtidas foram comparados através de análise de variância considerando os fatores: ambiente (CEAB e CEC), cultivares de milho (BRS 1010, BRS 3003, BRS 4157 e BR 106), parte da planta (colmo e raiz) e adubação com N (suplementação ou não com ureia).

A similaridade entre os isolados, através de suas características fenotípicas foi avaliada por uma matriz binária, sendo atribuído valor positivo para a presença da característica e valor negativo para a ausência de característica. Os dados foram comparados e a similaridade entre os isolados foi estimada pelo coeficiente *Simple Matching-SM-*, e agrupada pelo método das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa NTSYS (Numerical Taxonomy System Using Multivariate Statistical Program), versão 2.1 (ROHLF, 1994).

O índice de diversidade de Shannon-Weaver foi calculado considerando-se os grupos morfológicos originados na análise de similaridade e contraste de valores analisado pelo teste t de Hutcheson (Hutcheson, 1970). Obteve-se o valor tabela do de  $t_{(\alpha; GL)}$  para comparar com o  $t_{\text{calculado}}$ . Quando o valor calculado foi maior que o tabelado, aceitou-se a hipótese alternativa de que amostras ou áreas possuíam índice de Shannon-Weaver estatisticamente diferente para o nível de probabilidade de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Número de Bactérias Endofíticas nas Plantas de Milho**

A população total de bactérias endofíticas observadas em meio de cultura DYG'S (RODRIGUES NETO et al., 1986) foi de 537 isolados, sendo 183 isolados oriundos de área de cerrado e 354 isolados oriundos de área de mata. Destes, 340 isolados foram obtidos de raízes e 197 da parte aérea (colmo). Com essa contagem, estimou-se a população total de bactérias endofíticas, tendo ocorrido, para todas as cultivares, frequência significativamente maior nas raízes, comparativamente ao colmo (Tabela 3).

O grande número de bactérias no sistema radicular parece ser regra e representa uma resposta dos microrganismos à presença do vegetal. A grande área superficial das raízes é um habitat para abrigar uma grande densidade e diversidade de bactérias, desde saprofitas a comensais, mutualísticas, simbióticas, endofíticas e patogênicas (WELBAUM et al., 2004). Assim, o crescimento radicular implica no aumento de substratos de carbono na zona radicular, os quais promovem a proliferação de rizobactérias em face deste ambiente rico em alimento, o que explica, ao menos parcialmente, a maior densidade de bactérias detectada nas raízes das plantas de milho. O maior número de bactérias nas raízes comparativamente ao colmo de milho, provavelmente, se deve ao fato desta parte da planta representar o primeiro local de entrada dos endofíticos (LODEWYCKX et al., 2002).

Mecanismos de penetração e distribuição são necessários para que as bactérias colonizem o interior dos tecidos da planta, sendo que tais mecanismos podem ocorrer devido à interação com outras bactérias ou a diferente necessidade de cada organismo – planta ou bactéria - que determinam a colonização de diferentes nichos dentro da planta (LODEWYCKX et al., 2002). Provavelmente, apenas parte da população que coloniza o sistema radicular migra para a parte aérea, refletindo em menor população e diversidade, como evidenciado pelo uso de fontes de carbono por bactérias diazotróficas isoladas de cana-de-açúcar (BARBOSA et al., 2006).

**Tabela 3** - Número de Bactérias Endofíticas Totais e Número de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Plantas de Milho e % de Bactérias Endofíticas Diazotróficas Coletadas em Área de Cerrado (CEAB) e Mata (CEC) no Estado de Roraima.

Ambiente	Parte planta	Cultivares	Nº de bactérias endofíticas (x 10 <sup>3</sup> ) <sup>1</sup>	Nº de bactérias endo. diazotróficas totais (x 10 <sup>3</sup> ) <sup>1</sup>	% de diazotrófic em relação às tota
CERRADO (CEAB)	Raiz	BRS 1010	663,00	5,83	1,58 <sup>2</sup>
		BR 106	369,0	7,5	1,82 <sup>2</sup>
		BR 4157	1005,0	1,67	0,60
		BRS 3003	170,0	0,83	0,64
	Parte aérea	BRS 1010	9,17	ND <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>
		BR 106	4,17	ND <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>
		BR 4157	83,3	0,83	0,59
		BRS 3003	5,83	ND <sup>3</sup>	ND <sup>3</sup>
MATA (CEC)	Raiz	BRS 1010	127,0	2,5	1,06
		BR 106	153,0	2,5	0,93
		BR 4157	922,0	10,8	0,91
		BRS 3003	90,0	4,17	1,38
	Parte aérea	BRS 1010	1,33	0,08	0,35
		BR 106	0,62	0,08	0,81
		BR 4157	2,49	0,08	0,18
		BRS 3003	1,58	0,04	1,73

1: Número de bactérias por grama de tecido vegetal fresco;

2: Significativamente superior em relação às mesmas cultivares e parte da planta pelo teste t em 5% de probabilidade;

3: Não detectado pelo método;

Obs.: Dados transformados pela equação  $Y + 1.0 - \text{SQRT} ( Y + 1.0 )$

## DENSIDADE E FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

Semelhantemente ao número total de bactérias endofíticas, observou-se maior número de bactérias diazotróficas endofíticas nas raízes das plantas de milho, para todas as cultivares (Tabela 3). A população de bactérias diazotróficas endofíticas

isoladas variou de 0,83 a  $10,8 \times 10^3$  células  $g^{-1}$  de tecido vegetal no sistema radicular e foi de no máximo 0,83 células  $g^{-1}$  de tecido vegetal no colmo (Tabela 3).

Tal fato corrobora outros estudos avaliando culturas como, milho (ROESCH, 2007; QUADROS, 2009), arroz (RODRIGUES et al., 2006) e cana-de-açúcar (REIS JUNIOR et al., 2000), quando se constatou que a população de bactérias diazotróficas endofíticas é maior nas raízes do que na parte aérea das plantas. Liu et al. (2006) estudando a colonização de milho e arroz por *Bacillus megaterium* observaram que esta bactéria migrou lentamente das raízes em direção ao colmo e as folhas, mostrando assim, que apenas poucas células bacterianas podem ser encontradas nas partes aéreas dessas plantas.

Comparativamente a outros trabalhos da literatura, o número de bactérias diazotróficas endofíticas observado pode ser considerado baixo para uma Poaceae, quando frequentemente são observadas populações de até  $10^8$  células  $g^{-1}$  de tecido vegetal de arroz (RODRIGUES et al., 2006), trigo (SALA et al., 2005) e cana-de-açúcar (REIS JUNIOR et al., 2000). É preciso considerar que nestes trabalhos a obtenção das bactérias diazotróficas endofíticas classicamente foi realizada diretamente em meios semi-sólidos seletivos ou semi-seletivos, seguida de estimativa da população de bactérias através de tabelas de Número Mais Provável - NMP - (DÖBEREINER, 1995). Ao contrário, nesse trabalho o isolamento foi realizado em placas de Petri contendo o meio de cultura DYG's sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986), que representa um meio pouco seletivo para o desenvolvimento de bactérias e muito rico em nutrientes, permitindo o isolamento amplo e com baixa pressão de seleção, diferindo, portanto, de outros trabalhos.

Aparentemente, apesar de demandar maior trabalho laboratorial, o uso do meio DYG's (RODRIGUES NETO et al., 1986) fornece informações mais realísticas do número de bactérias, uma vez que preconiza a contagem direta em placas e não uma estimativa. E, além disso, também favorece bactérias raras que não teriam habilidade para crescer nos meios tradicionalmente utilizados. Isto torna-se pertinente pelo fato de que pode existir competição entre bactérias consideradas mais frequentes como *Azospirillum* e as menos frequentes *Azoarcus*, respectivamente (RODRIGUES, 2003). Segundo Reinhold-Hurek et al. (1993), a predominância bacteriana do gênero *Azoarcus* no interior da raiz da gramínea "Kallar grass" foi favorecida após desinfestação superficial,

o que poderia ter reduzido a quantidade de *Azospirillum*.

Além disso, o insucesso no isolamento de *Gluconacetobacter johannae* e *G. azotocaptans* em cana-de-açúcar e a baixa diversidade observada na espécie *G. diazotrophicus* foi atribuída a produção de bacteriocina por 2 grupos de bactérias da espécie *G. diazotrophicus* (MUÑOZ-ROJAS et al., 2005). Desta forma, a estratégia de utilização de meio de cultura sólido tende a diminuir este efeito negativo de competição.

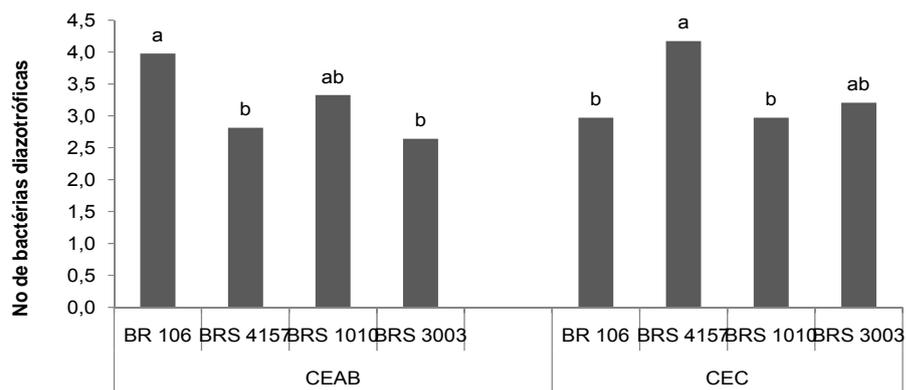
Entre as cultivares de milho, observou-se diferenças significativa no percentual dos números de bactérias diazotróficas e, também, interação entre as cultivares e os ambientes (Tabela 3). Ao passo que no CEC todas as cultivares apresentaram percentagem de bactérias diazotróficas significativamente igual em relação ao total de bactérias, no CEAB, as cultivares BR 106 e BRS 1010 tiveram maior quantidade dessas bactérias em relação as demais cultivares, chegando a mais de 1,5% da população do total de bactérias (Tabela 3). Vale destacar, contudo, que apesar de não significativa, no CEC, a cultivar BRS 3003 apresentou uma percentagem de bactérias diazotróficas expressivamente maior – mais de 1,5% - enquanto as demais cultivares apresentaram valores abaixo de 0,85% em relação ao número total de bactérias.

A interação entre cultivares e ambientes também foi observada para o número de bactérias endofítica diazotróficas avaliadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade (Figura 1). Nesse caso, em ambos ambientes houve diferença significativa no número total de bactérias endofítica diazotróficas, sendo no CEAB, número significativamente maior para a cultivar BR 106, seguida de BRS 1010, a qual não diferiu das outras duas cultivares. Por outro lado, no CEC, o maior número de bactérias isoladas ocorreu na cultivar BRS 4157, seguida de BRS 3003, que não diferiu das demais (Figura 1).

Esta diferença entre cultivares representa um fato comumente reportado na literatura, as variedades de milho tendem a apresentar respostas positivas em relação colonização com bactérias diazotróficas endofíticas (BLECKER; LÉON, 1988). Também

foi mostrado que o genótipo da planta interfere na resposta à inoculação, como foi demonstrado para trigo (AVIVI; FELDMAN, 1982), milho (GARCIA DE SALOMONE et al., 1996) e cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 1992). Neste último estudo, usando a metodologia de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , os autores mostraram a diferença entre variedades de cana-de-açúcar quanto ao ganho de N derivado da FBN.

Aparentemente, esta característica das variedades de milho poderia estar relacionada com a estrutura genética da planta e da própria bactéria que influenciam no resultado da interação genótipo x ambiente x bactéria. Geneticamente falando, é esperado que genótipos heterozigotos fossem menos suscetíveis às variações ambientais que os homozigotos, e que populações heterogêneas sejam mais tolerantes que as homogêneas (BLECKER; LÉON, 1988).



**Figura 1** - Densidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Obtidas de Raízes de Cultivares de Milho.

Valores seguidos de mesmas letras, para um mesmo ambiente, não diferem significativamente entre si pelo teste t em 5% de probabilidade. C.V.(%) = 29,83

Obs.: Dados foram transformados pela equação  $Y + 1.0 - \text{SQRT}(Y + 1.0)$

Nesse trabalho, a contagem de bactérias diazotróficas endofíticas também mostrou interação entre ambiente e cultivares com a aplicação de nitrogênio na adubação de plantio do milho pelo teste t a 5% de probabilidade (Figura 2). Nessa Figura, observa-se que, tanto em área de mata alterada quanto no cerrado, houve frequência significativamente maior de bactérias diazotróficas endofíticas em relação ao total de bactérias para dois dos cultivares quando se utilizou adubação nitrogenada, comparativamente ao tratamento sem

nitrogênio. Na mata, a cultivar BRS 3003 apresentou maior frequência de diazotróficos quando recebeu nitrogênio, o que aconteceu também para a BR 106 em área de cerrado (Figura 2).

Considerando todas as cultivares, no cerrado houve menor proporção de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas no tratamento sem N em comparação a aplicação de N, obteve-se 5 e 18 bactérias, respectivamente. Ao passo, que na área de mata, no tratamento sem N obteve-se 17 bactérias e 15 com N, respectivamente.

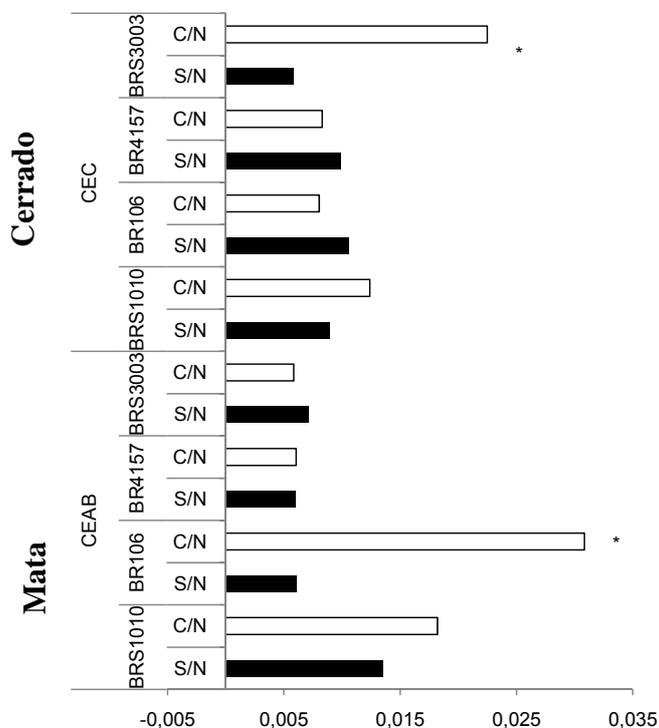
De forma generalizada, parece existir um consenso que a presença de nitrogênio mineral inibe a presença e a atividade de bactérias endofíticas diazotróficas, assim como a diversidade genética desses organismos em plantas da família Poaceae (CABALLERO-MELLADO ; MARTÍNEZ-ROMERO, 1994; CABALLERO-MELLADO et al., 1995; GONZALEZ; BARRAQUIO, 2000; PERIN et al., 2004). E, esta inibição poderia se dar tanto pelo fato da planta preferencialmente utilizar N mineral, o qual apresentaria menor custo energético, ou ainda pelo fato dos íons amônio inibirem estes organismos dentro dos tecidos do vegetal, como demonstrado para cana-de-açúcar (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002).

Por outro lado, também tem sido observado que a aplicação de nitrogênio pode favorecer a atividade das bactérias endofíticas diazotróficas na planta. Tal fenômeno está sendo atribuído ao fato da planta, especialmente em solos oligotróficos, apresentar um melhor “status” nutricional quando fertilizada com N, o que favoreceria melhores condições de desenvolvimento bacteriano e pode explicar a baixa quantidade de bactérias diazotróficas obtidas do tratamento sem N no cerrado.

De fato, em alguns casos a inoculação de bactérias na presença de pequenas doses de fertilizantes nitrogenados tem mostrado uma maior eficiência para o sistema planta/bactéria quando comparado com o uso isolado da bactéria. Foi observado que o efeito da inoculação em milho e trigo foi mais pronunciado quando houve inoculação e doses pequenas de N (DOBBELAERE et al., 2002) e que as bactérias não são inibidas pela presença de nitrogênio (PRADO JÚNIOR, 2008).

Além disso, é possível também, que em plantas mais nutridas, as bactérias diazotróficas endofíticas sejam capazes de produzir fitohormônios de forma mais

pronunciada e, dessa forma, a promoção do crescimento vegetal se daria também por essa via, haja vista, muitas diazotróficas também apresentarem esta característica.



**Frequência de bactérias endofíticas totais por grama de plantas**

**Figura 2** - Frequência de bactérias endofítica diazotróficas ( $N^{\circ}/N^{\circ}\text{total}/\text{grama de planta}$ ) em área de cerrado e mata no estado de Roraima em solos suplementados ou não com nitrogênio. Mostrando o efeito do Nitrogênio. \*Valores seguidos de mesmas letras, cultivados no mesmo ambiente, não diferem significativamente entre si pelo teste t em 5% de probabilidade. C.V.(%) = 59,12. Obs.: Dados foram transformados pela equação  $Y + 1.0 - \text{SQRT} ( Y + 1.0 )$

## CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE PLANTA DE MILHO

As 55 bactérias diazotróficas endofíticas foram caracterizadas fenotipicamente em meio de cultivo DYG's, além dos semi-seletivos e, posteriormente agrupadas considerando-se as características apresentadas nos meios através do índice de similaridade - SM (Simple Matching). Dessa forma, quatro dendrogramas foram obtidos – um para cada

meio de cultura. Observou-se que a maioria das bactérias diferiam consideravelmente dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* utilizados como referência. Diante dessa observação, optou-se por realizar uma análise de similaridade com as características observadas em todos os meios de cultivo conjuntamente em uma única matriz.

Considerando uma similaridade de 85% entre as bactérias, constatou-se a formação de doze grupos fenotípicos (Figura 3; Tabela 4), sendo que as bactérias utilizadas como referências distribuíram-se em três grupos. As espécies *H. seropedicae*, *B. tropica* e *A. amazonense* posicionaram-se no grupo 1, juntamente com outros 5 isolados desse trabalho. Normalmente, estas 3 bactérias, vem sendo isoladas em plantas de milho e outros cereais, pelos meios de cultura NFb, JMV e LGI, respectivamente (RODRIGUES et al., 2006; PERIN, et al., 2006). Contudo, observou-se que todas apresentaram crescimento em todos os meios testados, evidenciando, que são capazes de utilizar as fontes de carbono: manitol, sacarose e ácido málico. Vale destacar, que não é possível inferir que os isolados agrupados com estas bactérias referências sejam pertencentes a uma destas espécies, apenas com base nas características fenotípicas e fisiológicas avaliadas, sendo necessário para tanto análise de biologia molecular das bactérias isoladas.

A bactéria *B. kururiensis*, também utilizada como referência, se agrupou juntamente com outras 8 bactérias oriundas da cultivar BR 106 e BRS 1010 isoladas na área de cerrado (Figura 2), sendo que todas também se desenvolveram em todos os meios de cultura avaliados. Esta bactéria, igualmente às anteriores, aparentemente apresenta baixa especificidade hospedeira, tendo sido constatada em plantas de milho, café, cana-de-açúcar e arroz (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006).

A outra bactéria referência, *A. brasilense*, agrupou-se tanto com bactérias oriundas da mata quanto do cerrado, cujo grupo não apresentou crescimento no meio de cultura JMV, o qual apresenta manitol como fonte de carbono e pH 5,5. Também esta bactéria foi encontrada em milho (BALDANI et al., 1997).

Plantas de milho podem ser colonizadas simultaneamente por inúmeras bactérias. Uma diversidade de diazotróficos tem sido identificada em milho como *Azospirillum*,

*Herbaspirillum* e *Klebsiella* dentre outros (BALDANI et al., 1980, 1986; CHELIUS; TRIPLETT, 2001). Recentemente, novas espécies diazotróficas foram descritas em associação com milho como *A. zae* e *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007<sup>a</sup>; 2007<sup>b</sup>), indicando que número de espécies descritas tende a crescer nos próximos anos.

Dos mais de 80 gêneros endofíticos cultiváveis, pouco mais de uma dezena são reconhecidamente diazotróficos. Estes resultados indicam claramente a necessidade de se reavaliar as estratégias atualmente adotadas para que seja possível a descrição da biodiversidade total das bactérias diazotróficas associadas às plantas (ROESCH, 2007).

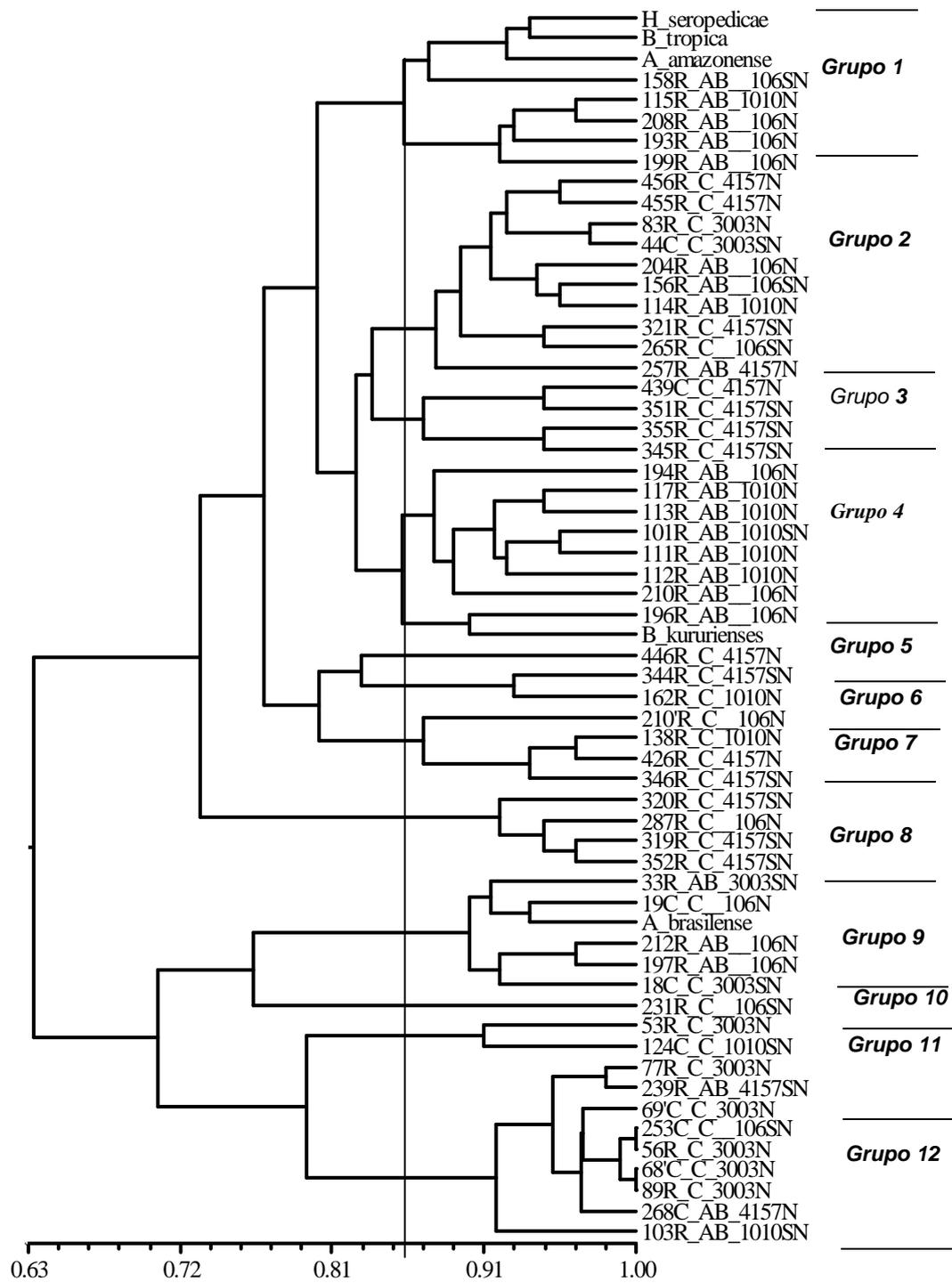
Semelhantemente a outros trabalhos presentes na literatura, frequentemente isolados de bactérias diazotróficas oriundas de amostras vegetais de ambientes tropicais apresentam pouca semelhança com características fenotípicas, fisiológicas e mesmo genotípicas de estirpes tradicionalmente utilizadas como referência (PERIN, 2007). A despeito de discrepâncias entre características fenotípicas inicialmente observadas de novos isolados com bactérias referências, espécies novas vem sendo descritas, como é o caso de *Burkholderia silvatlantica* para cana-de-açúcar (PERIN et al., 2006).

Neste sentido, é pertinente mencionar que entre os diversos grupos fenotípicos observados nesse trabalho, existe a possibilidade de estarem presentes novas espécies bacterianas, o que exige etapas posteriores de identificação taxonômica.

Na análise de similaridade, de maneira geral, observaram-se bactérias predominantemente agrupadas de acordo com a cultivar e, ou ambiente onde foram isoladas e outras distribuídas por vários grupos (Figura 3 e Tabela 4). As bactérias presentes nos grupos 1 e 4 foram isoladas apenas no cerrado nas cultivares BR 106 e BRS 1010. Por outro lado, os grupos 3, 7 e 8 – com pelos menos 4 bactérias cada – e os grupos 5, 6, 10 e 11 – a maioria com apenas uma bactéria – foram exclusivos da área de mata. Sendo importante destacar que o grupo 3 teve apenas bactérias oriundas da cultivar BRS 4157, e no grupo oito houve predomínio de bactérias também dessa cultivar. Os demais grupos – 2, 9 e 12 – apresentaram bactérias provenientes de ambas as áreas e mais de uma cultivar de milho.

É importante destacar ainda, que não houve agrupamento de bactérias em função da presença de nitrogênio, com exceção do grupo 5 com apenas 1 isolado, o que

evidencia que este elemento aparentemente favoreceu a densidade de bactérias em determinados grupos, sendo que estes reuniram bactérias isoladas também de amostras sem nitrogênio. Ainda outra observação, foi a não formação de grupos exclusivos com bactérias oriundas do colmo, o que evidencia que as bactérias presentes na raiz, são aquelas que posteriormente colonizaram o colmo das plantas de milho, como destacado por Liu et al. (2006).



**Figura 3** - Dendrograma de similaridade baseado no Coeficiente SM (Simple Matching) e UPGMA (Unweighted Pair Group Method) dos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e bactérias de referência nos meios DYG'S, NFb (3x), LGI, JMV provenientes dos cultivares de milho.

**Tabela 4** - Grupos fenotípicos de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cultivares de milho no cerrado e mata e respectivas características utilizadas para a elaboração do dendrograma de similaridade.

Grupos fenotípicos	Ambiente		Cultivar de milho				Parte da Planta		Nitrogênio		N <sup>o</sup> isolados	Principais características nos meio de cultura semiseletivos			
	AB	CO	1010	3003	106	4157	R	C	Sim	Não		DYG'S	NFB	JMV	LGI
1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	5	a1-a2, b1, c1, d1, e2, f1, g2	a1, b1, c2-c3, d1, e2, f2, g8, g9	a2, b1-b2, c2, d1-d2, e1- e2, f1- f2, g3	a1-a2, b1, c2, d1, e1-e2, f1-f2, g3, g7, g10-g11
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	a1-a2, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2, f1-f2, g2 ou, g3-g4	a1, b1, c1-c2, d1, e1-e2, f1, g1 ou, g2-g5	a1, b1, c2, d1, e1-e2, f1, g1, g2-g3-g5	a1-a2, b1, c2, d1, e1-e2, f1, g2-g3-g5-g7
3	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	4	a1-a2, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2, f1-f2, g2-g3-g4	a1-a2, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2, g11-g12	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g 2-g6	a1-a2, b2-b3, d1, e2, f1, g6
4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	8	a1 e a2, b1, c2, d1, e2, f1-f2, g2-g3	a1, b1, c3, d1, e2, f1-f2, g2-g8	a1-a2, b1, c2-c3, d1-d2, e1-e2, f1-f2, g6-g11	a1-a2, b1, c2, d1, e2, f1-f2, g3-g11
5	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	1	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g2	a1, b1, c2, d1, e1, f1, g2	a2, b1, c2, d1, e2, f2, g13	a2, b1, c2, d1, e2, f2, g2
6	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	2	a2, b2, c1, d2, e1-e2, f1-f2, g1-g2	não houve crescimento	a2, b1, c2, d1, e2, f2, g13	a2, b1, c2, d1, e1-e2, f1, g2
7	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	4	a1-a2-a3, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2, f1-f2, g2-g3	não houve crescimento	a1-a2, b1-b2, c2, d1-d2, e2, f1, g2-g3	a1-a2, b1-b2, c2, d1-d2, e1-e2, f2-f2, g6-g7
8	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	4	a1-a2, b1-b2, c1, d1, e1-e2, f1-f2, g1-g4-g12	a2, b2, c1, d2, e1, f2, g2-g12	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g2-g3	a2, b2, c1, d2, e1, f2, g12
9	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	5	a1-a2, b1, c1-c2, d1, e1-e2, f1-f2, g2-g3-g4	a1, b1, c1-c3, d1, e2, f1-f2, g8,-g9-g5	não houve crescimento	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g3-g7
10	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	1	a3, b2, c2, d2, e1, f2, g2	não houve crescimento	não houve crescimento	a2, c1, c2, d1, e1, f1, g7
11	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	2	a2, b1, c2, d1, e2, f1, g2-g3	a1, b1, c1, d2, e1-e2, f1-f2, g1-g8	a2, b1, c2, d1, e2, f1-f2, g13	não houve crescimento
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	a1-a2, b1, c2, d1, e2, f1, g1-g2-g3-g4	a1, b1, c2, d1, e2, f2, g8-g9	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g3	não houve crescimento

Tamanho: a1: pequena, a2: média, a3: grande; Forma: b1, circular, b2: irregular; Elevação: c1: plana, c2: elevada, c3: convexa; Borda: d1: lisa, d2: ondulada; Transparência: e1: transparente, e2: opaca; Aspecto da colônia: f1: homogênea, f2: heterogênea; Cor: g1: branca, g2: bege, g3: amarela, g4: salmão, g5: rosa, g6: laranja, g7: verde, g8: centro azul e borda branca, g9: centro verde e borda branca, g10: centro preto e borda transparente, g11: centro amarelo e borda transparente, g12: centro branco e borda transparente, g13: centro amarelo escuro e borda clara. AB – Campo Experimental Água Boa; CO – Campo Experimental Confiança; 1010 – BRS 1010; 3003 - BRS 3003; 106 – BR 106; 4157 – BR4157; R-raiz; C-colmo.

## **DIVERSIDADE DE GRUPOS FENOTÍPICOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DIAZOTRÓFICAS NAS PLANTAS DE MILHO**

Houve maior riqueza de grupos fenotípicos – maior número de grupos - de bactérias diazotróficas endofíticas na área de mata, comparativamente ao cerrado, 10 e 5 grupos, respectivamente. Entre as cultivares maior riqueza de grupos fenotípicos decresceu na seguinte ordem: BR 106, BRS 4157, BRS 1010 e BRS 3003, as quais apresentaram 8, 7, 6 e 4 grupos respectivamente (Tabela 4).

Com base na riqueza de grupos fenotípicos e na distribuição das bactérias dentro dos respectivos grupos, calculou-se o índice de diversidade de Shannon-Weaver. Este índice ecológico tem sido considerado padrão para estimar a diversidade de espécies de forma sensível, levando em consideração a uniformidade e abundância de espécies (ATLAS; BARTHA, 1998).

Entre os ambientes avaliados, maior índice de diversidade de grupos fenotípicos de bactérias diazotróficas endofíticas de milho foi observado na área de mata comparativamente ao cerrado (Figura 4). E, entre as cultivares, maior diversidade foi observada para as variedades de milho, BR 106 e BRS 4157, enquanto para os híbridos isso ocorreu para a cultivar BRS 1010 e menor para BRS 3003, a qual apresentou índice de diversidade significativamente inferior ao observado para as variedades (Figura 4).

A maior riqueza e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofítica observadas na área de mata (Figura 4), indica que neste ambiente existem determinadas características edafoclimáticas que favorecem o desenvolvimento e estabelecimento de maior número de espécies de bactérias. Tais características são na maioria das vezes complexas e se estabelecem por condicionantes químicos, físicos, além dos biológicos (WIDMER et al., 1999; POLY et al., 2001). Fatores ambientais como tipo de solo e regime hídrico são fatores determinantes da estrutura da comunidade de diazotróficos (TAN et al., 2003). Se a comunidade de bactérias endofíticas diazotróficas é representada por uma fração da comunidade microbiana presente no solo (SEGHERS et al., 2004), então a composição da comunidade endofítica será determinada pela influência ambiental e a especificidade entre microorganismos e hospedeiro.

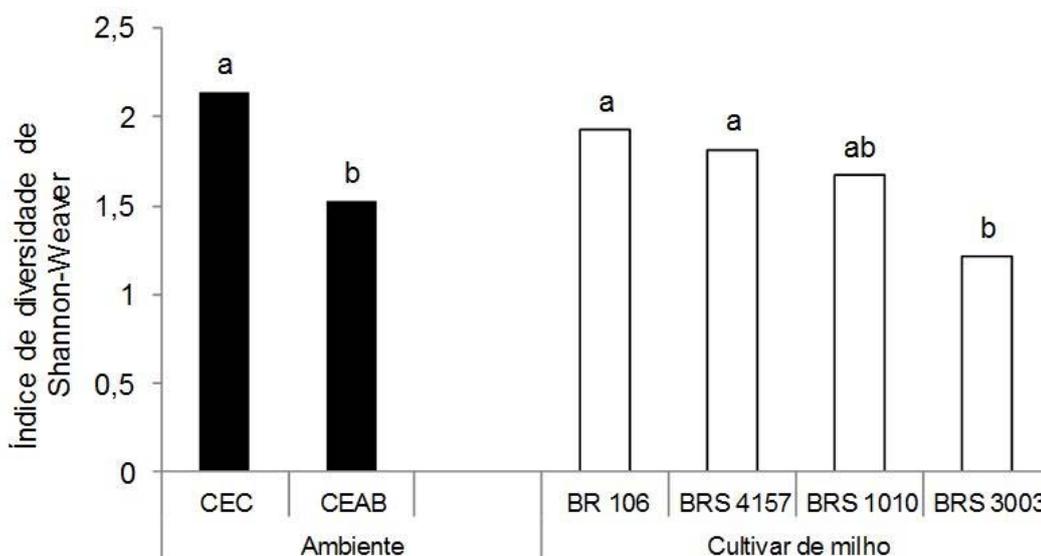
Na análise de solo realizada no período de coleta das plantas de milho (Tabela 1) observou-se que no solo de mata havia mais que o dobro de matéria orgânica, comparativamente a área de cerrado e também maior teor de argila. Além disso, de forma geral, observaram-se também maiores teores dos micronutrientes Zn, Fe e Mn em solo de mata. Por outro lado, na parte aérea das plantas observaram-se maiores teores de Zn no tecido vegetal na área de mata e menores teores de Co e Mo comparados às plantas de milho do cerrado. Todas as cultivares de milho com suplementação de N na área de cerrado – CEAB, apresentam maior quantidade de N nas folhas, enquanto que na área de mata – CEC, nem todas com suplementação de N apresentam maior quantidade de N nas folhas (Tabela 2). Isso indica que na área de cerrado o N mineral foi totalmente utilizado enquanto que na área de mata o mesmo não aconteceu.

Em trabalhos realizados no Rio Grande do sul, os autores verificaram que bactérias diazotróficas endofíticas oriundas de plantas de milho variam de diversidade genética dependendo das condições edafoclimáticas da região onde foram coletadas, tendo sido sugerido que o pH do solo, matéria orgânica, e teores de argila, além da pluviosidade estariam influenciando a diversidade destes microrganismos (ROESCH et al., 2007).

Entre as cultivares, o fato de ter havido maior riqueza e diversidade nas variedades, aparentemente indica que genótipos heterozigotos possibilitariam a associação do vegetal com um maior número de espécies bacterianas. O que não necessariamente seria uma regra, pois o híbrido BRS 1010 apresentou diversidade igual às variedades avaliadas.

De fato, existe certo consenso que variedades de milho tendem a se associar mais facilmente com bactérias diazotróficas e, assim obterem maior quantidade de N via fixação biológica. Contudo, alguns trabalhos têm mostrado que não necessariamente as variedades de milho apresentam melhores respostas a inoculação. Alves (2007) observou que o híbrido SHS 5050 foi capaz de se beneficiar mais da inoculação com *Herbaspirillum* que a variedade BRS 4157 e BR 106 quando as avaliações foram realizadas em condições de campo. Por outro lado, quando as avaliações foram realizadas em substrato estéril foram observados incrementos significativos na biomassa vegetal da cultivar BRS 4157

quando inoculada. Estes resultados sugerem que esta variedade tem uma adaptação às espécies bacterianas nativas, as quais poderiam competir com a bactéria inoculante e restringir a fixação biológica de nitrogênio. Vale destacar que também trabalhos realizados em Roraima mostraram incrementos significativos de produtividade em função da inoculação para o híbrido BRS 1010, enquanto não houve resposta significativa para BRS 4157, quando inoculadas também com *Herbaspirillum* (ZILLI et al., 2007).



**Figura 4** – Diversidade de Grupos Fenotípicos de Bactérias Endofíticas Diazotróficas Isoladas de Cultivares de Milho em Área de Cerrado (CEAB) e Mata (CEC) no Estado de Roraima. \* Médias seguidas de mesma letra, dentro de ambiente ou cultivar de milho, não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

## CONCLUSÕES GERAIS

Em ambos os ambientes estudados houve grande riqueza de grupos fenotípicos de bactérias endofíticas de milho obtidas no meio de cultura DYG`s sólido, tendo ocorrido maior frequência dessas bactérias nas raízes comparativamente ao colmo das plantas;

Tanto a percentagem de bactérias diazotróficas endofíticas em relação ao número total de bactérias endofíticas, quanto o número de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas refletiram uma interação entre as cultivares de milho e os ambientes;

As cultivares BR 106 (híbrido) e BRS 1010 (cultivar), do cerrado, e BRS 4157 (híbrido) e BRS 3003 (cultivar), da mata, apresentaram as maiores densidades de bactérias diazotróficas endofíticas, mostrando haver interação entre genótipos de milho e ambiente;

A adubação nitrogenada favoreceu maior densidade de bactérias diazotróficas endofíticas, nas cultivares BR 106 e BRS 3003, nos ambientes de cerrado e de mata respectivamente;

Maior diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas foi constatada nas plantas de milho cultivadas na área de mata.

## REFERENCIAS

- ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho**. 2007. 63p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4. ed. Redwood: Cummings Science, 1998. 694p.
- AVIVI, Y.; FELDMAN, N. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, v. 32, p. 237-241, 1982.

- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n. 5/6, p. 911-922, 1997a.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereais with *Azospirillum* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.
- BARBOSA, E. A.; PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Uso de fontes de carbono por *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolados de plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, , v.41, p.827-833, 2006.
- BLECKER, H. C.; LÉON, J. Stability analysis in plant breeding. **Plant Breeding**, v. 101, n. 1, p.1-23, 1988.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied Environmental Bacteriology**, v. 60, p. 1532-1537, 1994.
- CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; REIS, V. M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. **Applied and Environmental Bacteriology**, v. 61, n. 8, p.3008-3013, 1995.
- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p.783-787, 2001.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRY, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284-297, 2002.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Rio de Janeiro, RJ, 1997.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Burkholderia a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2790-2798, 2001.

GALLOWAY, J. N., ABER, J. D., ERISMAN, J. W., SEITZINGER, S. P., HOWARTH, R. W., COWLING, E. B., COSBY, J. B. The Nitrogen Cascade. **BioScience**, v. 53, n. 4, p.341-356, 2003.

GARCIA DE SALOMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p.249-256, 1996.

GONZALEZ, M. S.; BARRAQUIO, W. L. Isolation and characterization of *Acetobacter diazotrophicus* in *Saccharum officinarum* L., *Saccharum spontaneum* L., and *Erianthus* sp. **The Philippine Agricultural Scientist**, Manila, v. 83, n. 2, p.173-181, 2000.

HUTCHENSON, K. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. **Journal of Theoretical Biology**, v. 29, p. 151-154, 1970.

LIU, X.; ZHAO, H.; CHEN, S. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. **Current Microbiology**, v. 52, n. 3, p.186-190, 2006.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. van der. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, n. 6, p.583-606, 2002.

- MAGALHÃES, F. D.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 55, p.417-430, 1983.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Editora Ceres, 2006. 638p.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from corn rhizosphere., **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007b.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007a.
- MUÑOZ-ROJAS, J.; FUENTES-RAMÍRES, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain in culture media and in endophytic association. **FEMS Microbiolgy Ecology**, v. 54, p.57-66, 2005.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophic* (syn. *Acetobacter diazotrophic*): a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p.137-145, 2002.
- NEDER, R. N.; **Microbiologia: Manual de laboratório**. São Paulo: Nobel, 1992.
- PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 103f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- PERIN, L., BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.763-770, 2004.
- PERIN, L., MARTINEZ-AGUILAR, L., PAREDES-VALDEZ, G., Baldani, J. I., ESTRADA de LOS SANTOS, P., Caballero-Mellado, J. *Burkholderia silvatlantica* sp nov., a novel diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1931-1937, 2006.

POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, F.; MONROZIER, L.J. Comparison of nifH gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2255-2262, 2001.

PRADO JUNIOR, J. P. Q. **Qualidade e produtividade da cana-de-açúcar inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e adubada com nitrogênio mineral e orgânico**. 2008. 49f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo, Campinas, São Paulo.

QUADROS, P. D. de; **Inoculação de *Azospirillum* spp. em Sementes de Genótipos de Milho Cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen fixing Proteobacteria associated with roots of "Kallar grass" (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 43, n. 3, p.574-584, 1993.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p.985-994, 2000.

RODRIGUES NETO, J.; MALVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n.1-2, p.16, 1986.

RODRIGUES, L. da S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. 2003. 94f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 275-284, 2006.

ROESCH, L. F. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul.** 2007. 165f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O.; **Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1367-1380, 2007.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc** – Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: State University, 1994.

SALA, V. M. R., FREITAS, S. S., DONZELI, V. P., FREITAS, J. G., GALLO, P. B., SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p. 345-352, 2005.

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1475-1482, 2004.

TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Effect of Nfertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, v.5, p.1009-1015, 2003.

URQUIAGA, S; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society. Am. J.**, v.56, p.105-114, 1992.

WELBAUM, G. E.; STURZ, A. V.; DONG, Z.; NOWAK, J.; Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 23, n. 2, p.175-193, 2004.

WIDMER, F.; SHAFFER, B.T.; PORTEOUS, L.A.; SEIDLER, R.J. Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65 p.374-380, 1999.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; REIS, V. M., ALVES, G. C.; BALDANI, L. D.;  
CORDEIRO, A. C. **Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima.** Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2007. 20p. (Embrapa Roraima. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 06).







**Embrapa**

---

**Roraima**

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

