



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

CARACTERIZAÇÃO FENOTÓPICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Kamila E. **Moura**^{1a}; Renan C.F. **Magalhães**^{1b}; Raquel P. **Freitas-lório**^{1c}; Adriana P.D. **Silveira**^{1d}

¹ Instituto Agrônômico (IAC) - Centro de Solos e Recursos Ambientais

Nº 13149

RESUMO – A cana-de-açúcar é considerada uma cultura de grande importância no cenário econômico mundial, principalmente para o Brasil que é o maior produtor, por isso, ocorre grandes estudos em relação ao melhoramento da cultura, principalmente em relação a microbiota da planta. Já foram identificadas bactérias diazotróficas endofíticas em associação com cana-de-açúcar e determinado a sua influencia no aumento da fixação biológica de nutrientes (FBN), mas sem a especificidade das espécies, sendo assim, ocorrendo à necessidade de estudos mais detalhados quanto a aspectos fisiológicos/bioquímicos da interação planta e bactéria e a influencia sobre patógenos. Foram utilizados seis isolados que já apresentam um efeito positivo quanto à promoção de crescimento em mudas micropropagadas e avaliados quanto à morfologia e a produção de substâncias promotora de crescimento e antagônicas.

Palavras-chaves: substâncias promotoras de crescimento, substâncias antagonistas, inibição crescimento patógeno.

^a Bolsista CNPq/PIBITI: Graduação em Ciências Biológicas - milah_rox@hotmail.com, ^b Bolsista CNPq/PIBIC: Graduação em Ciências Biológicas- renanfavar@hotmail.com, ^c Bolsista CAPES: Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical, - raquel.p.f@hotmail.com, ^d Orientadora: Pesquisadora, Centro de Solos e Recursos Ambientais – IAC - apdsil@iac.sp.gov.br.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- *Sugarcane is considered an important crop in the global economy, especially for Brazil which is the largest producer of the world, therefore occurs huge studies in relation to crop improvement, especially in relation to plant microbiota. Have been identified diazotrophic bacteria in association with cane sugar and determined its influence in increasing nutrient fixation (BNF), but without the specificity of the species, so place the need for more detailed studies respects physiological / biochemical plant interaction and influence on bacteria and pathogens. We used six isolates that already have a positive effect as the promotion of growth in plantlets and evaluated the morphology and the production of growth promoting substances and antagonistic.*

Key-words: *growth-promoting substances, substances antagonists, inhibiting pathogen growth.*

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) tem uma grande importância econômica no cenário nacional e internacional (LUVIZOTTO, 2008). O Brasil é o maior produtor mundial, com uma safra estimada para o ano de 2013/14 na região Centro-Sul 589,60 milhões de toneladas um aumento de 10,67% comparado ao ano anterior (UNICA, 2013).

O Brasil tem investido em novas variedades da cana-de-açúcar por melhoramento genético, assim como o estudo da diversidade microbiana associada à planta, visando melhorar as características da cana-de-açúcar (LUVIZOTTO, 2008).

Estudos mostram que as comunidades bacterianas endofíticas podem participar da fixação biológica de nitrogênio atmosférico como as dos gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (LUVIZOTTO, 2008), e podem ser capazes de solubilizar nutrientes (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

De certo modo as bactérias podem influenciar o crescimento da planta, como a fixação biológica de nitrogênio, a produção de hormônios e substâncias antifúngicas. (OLIVARES, 2009).

Hormônios já puderam ser identificados como a auxina, citocininas, giberilinas e etileno em condições de cultivo. As auxinas estão ligadas a fatores de patogenicidade e crescimento, sendo o mais importante o ácido 3-indolacético (AIA) (OLIVEIRA et al., 2003).

O número de espécies descritas de bactérias diazotróficas tem aumentado devido a importância destas para a agricultura, entretanto a exploração da FBN depende do conhecimento das relações entre bactéria e planta (MARCHIORO, 2005).



2 MATERIAL E METODOS

Foram utilizados 6 isolados (IAC/BECa 090, IAC/BECa 095, IAC/BECa 099; 2. IAC/BECa 133, IAC/BECa 137, IAC/BECa 144) selecionados 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 para fixação biológica de nitrogênio.

2.1 Morfologia da colônia - Os isolados foram cultivados em placas contendo meio BDA pelo método de esgotamento, e incubadas por 2 a 4 dias, foram avaliados a coloração, consistência, diâmetro da colônia, produção de goma, elevação, forma, bordo e superfície.

2.2 Morfologia Celular e Coloração de Gram - Foi realizada de acordo com o protocolo de YANO et al. (1991), a morfologia celular foi analisada no microscópio óptico (VIDEIRA et al., 2007).

2.3 Presença de cápsulas - Foi realizada a visualização de cápsula pela coloração negativa com tinta-da-china por via húmida (VIDEIRA et al., 2007).

2.4 Teste de Oxidase - Suspensão bacteriana foi colocada em tiras de papel filtro e depositada uma gota de solução TEMED (1%). Bactérias que oxidaram o reagente ficaram com uma coloração roxa indicando reação positiva. (VIDEIRA et al., 2007).

2.5 Teste da Catalase – As bactérias foram crescidas em meio de cultura depois foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) na placa. O aparecimento de bolhas indica resultado positivo (MARINGONI, 2010).

2.6 Teste Hidrólise de Tween-80 - Os isolados foram inoculados em meio de cultura, depois de esterilizado adicionou Tween-80 em uma concentração final de 1% (v/v) e incubado. A presença de halo transparente ao redor da colônia indicou resultado positivo (MARINGONI, 2010).

2.7 Teste de Gelatinase - Os isolados foram crescidos em meio de cultura descrito por MARINGONI (2010), incubados por 7 dias e transferidos para geladeira. O resultado positivo foi indicado pela liquefação do meio de cultura após a refrigeração.

2.8 Produção de indólicas - Os isolados foram colocado em meio TSA 10% com membrana de nitrocelulose e incubados 2 dias. A membrana foi transferida para placa com solução de Salkowski, após 30 minutos foi observado um halo avermelho na membrana indicando o resultado positivo.



2.9 Capacidade de Solubilização de Fosfato - Foi preparado meio de cultura acrescido de solução de K_2HPO_4 e $CaCl_2$ para a formação de cálcio precipitado e vertido em placas. Os isolados foram inoculados e incubados por 3 dias na BOD. Colônias que formaram halo claro foram positivas (KATLNELSON & BOSE., 1959).

2.10 Produção de Sideróforos - Método adaptado de SCHWYN & NEILANDS (1987) e CATTELAN (1999).

2.11 Produção de citocininas e giberelinas - Método adaptado do bioensaio do cotilédone de rabanete para determinação de citocininas descrito por LETHAM (1971).

2.12 Produção de Quitinase - Este método foi adaptado de RENWICK et al. (1991). Foi adicionada quitina como única fonte de C no meio de cultura MLN, e vertido em placas. Os isolados foram inoculados e incubados por 10 dias na BOD, as colônias que formaram um halo claro foram capazes de degradar quitina.

2.13 Produção de β -1,3-glucanase - Método adaptado de RENWICK et al. (1991). Utilizou-se *b*,1,3-glucano como única fonte de C no meio MLN. Os isolados foram inoculados e incubados por 3 dias, a solução de vermelho Congo foi adicionada e após 90 minutos em temperatura ambiente surgiu um halo alaranjado ao redor das colônias indicando a produção de β -1,3-glucanase.

2.14 Produção de ácido cianídrico - Os isolados foram inoculados em meio B-King e incubados por 24 horas. Na tampa da placa havia um papel filtro com solução de ácido pícrico 0,5% e solução de Na_2CO_3 2%. A mudança de cor do papel amarelo para laranja indicou a produção de HCN.

2.15 Antagonismo a fitopatógenos - Os isolados foram submetidos a testes de atividade antifúngica a dois fungos fitopatogênicos *Sclerotynia* ssp e *Fusarium verticillioides*. Foi realizada a técnica de pareamento, e então submetidos a análise quanto à produção de substâncias voláteis, pela técnica de placas sobrepostas (DICK & HUTCHINSON, 1966), e não voláteis, pelo método do papel celofane (GIBBS et al., 1967) modificada para a utilização da cultura do antagonista crescida em meio líquido.

2.16 Teste de eficiência em casa de vegetação empregando mudas micropropagadas - Foram utilizadas mudas micropropagadas obtidas do meristema apical (SREENIVASAN e SREENIVASAN, 1984) da variedade IACSP 95-5000 e os isolados bacterianos. As mudas foram parcionadas e inoculadas (100 μ L) e mantidas por 7 dias em sala de crescimento, depois foram



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

transferidas para vasos com substrato. Depois de 2 meses foram novamente parcionadas, ficando 1 colmo por vaso e 5 plantas por tratamento onde receberam 5 ml do inoculo e foram mantidas um mês na casa de vegetação com sombrite 60% e o segundo mês sem sombrite. Após esse período foram transplantadas para vasos de 5 L de solo adubado com uma nova aplicação do inóculo (10ml). Após 1 mês foi avaliada quanto a massa da matéria seca da parte aérea da planta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia das colônias indicaram que o isolado IAC/BECa 144 possuiu cor amarelada já os demais branca e todos com consistência gomosa. O isolado IAC/BECa 133 apresentou elevação convexa e os outros côncavos. Os isolados IAC/BECa 90, 137 e 144 teve forma redonda e para os demais irregular. Borda lisa para os isolados IAC/BECa 95 e 137 e irregulares para os outros. Superfície pulverulenta para todos, exceto para o 144. As células com formato cocos.

No teste coloração de Gram apenas os isolados IAC/BECa 95, 99 e 137 foram positivos. Na catalase todos os isolados foram positivos, acelerando a quebra de peróxido de hidrogênio (tóxicos para as células) em água e oxigênio (REINER, 2010). Na hidrólise de Tween-80 e gelatinase os resultados foram positivos para IAC/BECa 90, 95 e 99. Na produção de Indólicas apenas o isolado IAC/BECa 99 indicou resultado positivo (tabela 1), podendo estar relacionado com produção de fitohormônios como o ácido 3- indol acético (RADWAN et al., 2005). Nos testes de presença de cápsula, oxidase e solubilização de P os resultados foram negativos.

Tabela 1. Análises *in vitro* quanto a coloração de Gram, presença de cápsulas, teste da oxidase, teste da catalase, hidrólise de Tween-80, teste da gelatinase, produção de substâncias Indólicas e capacidade de solubilização de fosfato.

ISOLADO	Coloração de Gram	Presença de cápsula	Teste de Oxidase	Teste da Catalase	Hidrólise de Tween-80	Teste da Gelatinase	Produção de Indólicas	Capacidade de Solubilização de P
IAC/BECa 90	-	-	-	+	++	+	-	-
IAC/BECa 95	+	-	-	+	+	+	-	-
IAC/BECa 99	+	-	-	+	++	+	+	-
IAC/BECa 133	-	-	-	+	-	-	-	-
IAC/BECa 137	+	-	-	+	-	-	-	-
IAC/BECa 144	-	-	-	+	-	-	-	-

No teste para produção de citocininas e giberilinas não houve resultados significativos. As citocininas são responsáveis pelo aumento do peso dos cotilédones, já as giberilinas pelo aumento de comprimento dos hipocótilos (CATTELAN *et al*, 1999).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Não houve diferença significativa quanto a promoção de crescimento de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar com o tratamento dos isolados (Tabela 2).

Os isolados produziram quitinase e β -1,3-glucanase (tabela 2) que são capazes de degradar os principais constituintes da parede celular de fungos fitopatogênicos (STANGARLIN, J. R 2010). O ácido cianídrico também ajuda na inibição do patógeno (PELZER, 2010).

Todos os isolados foram capaz de inibir o crescimento da *Sclerotynia* ssp. Pelo teste de pareamento (PR). Os isolados IAC/BECa 90 apresentou inibição de 92,94% do crescimento do patógeno pela produção de substâncias não voláteis (SNV). Os isolados, IAC/BECa 99, 133 e 137 apresentaram inibição de 43,18%, 53,76% e 65,53%, respectivamente pela produção de substâncias voláteis (SV). O isolado IAC/BECa 144 apresentou inibição de 42,94 % e 36,47% pela produção de substâncias voláteis e não voláteis (SNV e SV) respectivamente. O isolado IAC/BECa 95 não apresentou inibição significativa nos teste de substâncias voláteis e não voláteis (Tabela 2).

No teste do pareamento (PR) os isolados IAC/BECa 90, 95, 137 e 144 foram capaz de inibir a *F. verticillioides*. No teste de substâncias não Voláteis (SNV) apenas o isolado IAC/BECa 90 obteve resultado significativo sobre o controle. No teste de Substâncias Voláteis (SV) os isolados que mais inibiu o crescimento do patógeno foi o IAC/BECa 144 e 133.

Tabela 2. Massa de matéria seca da parte aérea (MMS) de plantas de cana-de-açúcar, atividade antagonista a *Sclerotynia* ssp. pelos isolados pelos teste do pareamento (PR), Substâncias não voláteis (SNV) e substâncias voláteis (SV) e produção de substâncias antagonistas como quitinase, β -1,3-glucanase e ácido cianídrico.

Tratamento	MMS-PA	Antagonismo						Produção de Quitinase	Produção de β -1,3 Glucanase	Produção de HCN
		PR		SNV		SV				
		cm	%	cm	%	cm	%			
Controle	4,884 ^a	8,50 ^c	0,00 [#]	8,50 ^c	0,00 [#]	8,50 ^c	0,00 [#]	-----	-----	-----
IAC/BECa 90	6,052 ^a	6,50 ^a	23,53	0,60 ^a	92,94	6,58 ^{bc}	22,55	-	+	-
IAC/BECa 95	6,668 ^a	7,37 ^b	13,29	7,20 ^{bc}	15,29	6,17 ^{bc}	27,45	+	-	+
IAC/BECa 99	5,190 ^a	7,37 ^b	13,29	7,30 ^c	14,12	4,83 ^{ab}	43,18	+	-	-
IAC/BECa 133	5,108 ^a	7,37 ^b	13,29	7,43 ^c	12,59	3,98 ^{ab}	53,76	+	-	-
IAC/BECa 137	5,784 ^a	7,13 ^b	16,12	7,00 ^{bc}	17,65	2,93 ^a	65,53	+	-	-
IAC/BECa 144	6,266 ^a	6,97 ^b	18,00	5,40 ^b	36,47	4,85 ^{ab}	42,94	+	-	-
CV%	22,58	2,16		10,62		19,56		-----	-----	-----

* médias comparadas pelo teste de Tukey - letras iguais não diferem a 5%

porcentagem de inibição do crescimento do patógeno



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Para a produção de sideróforos os isolados IAC/BECa 137 e 144 indicaram resultados negativos. O sequestro de ferro do solo é uma vantagem competitiva entre os microorganismos (FRAVEL, 1998). Inibindo o crescimento de fitopatógenos.

4 CONCLUSÃO

Através de metodologias químicas foi possível observar algumas características dos isolados, como produção de enzimas hidrolíticas que inibem os patógenos como *Sclerotynia* ssp e *Fusarium verticillioides* e substâncias que possam auxiliar na promoção de crescimento da cana-de-açúcar, como os fitohormônios.

5 AGRADECIMENTOS

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

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cattelan, A.J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p.
- Dick, C.M.; Hutchinson, S.A. Biological activity of volatile fungal metabolites. *Nature*, v. 211, p. 868, 1966.
- Fravel, D.R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p. 75-91, 1988.
- 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.
- Gibbs, J.N. A study of the epiphytic grow habit of *Fomes annosus*. *Annals of Botany*, v. 32, 1967.
- Katznelson, H.; Bose, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.79-85, 1959.
- Letham, D.S. Regulators of cell division in plant tissues – XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.25, p.391-396, 1971.
- Luvizotto, D.M. Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholdeira* ssp. Associada às raízes de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado):Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- Marchioro, L.E.T. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. Curitiba, 2005.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Maringoni, A.C. **Técnicas em Fitopatologia**. Editado Botucatu, 2010.

Olivares, F. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. **Boletim informativo da SBCS**. Janeiro-Abril, 2009.

Oliveira, A.L.M.; Uerquiaga, S.; Baldani, J.I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, ago. 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

Pelzer G.Q. Dissertação (Mestrado): Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. Boa vista 2010

Radwan,T.; El-S. El-D; Mohamed ,Z. K.; Reis, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.10, p.997-1004, 2005.

Reiner, K. America Society For Microbiology. Catalase Test Protocol. Nov. 2010. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/index.php/library/laboratory-test/3226-catalase-test-protocol>> Acesso em: 07/07/13.

Renwick, A.; Campbell, R., Coe, S. Assessment of in vivo screening systems for potential of biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v.40, p.524-532, 1991.

Rodriguez, H.; Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v.17, p. 319-339, 1999.

Schwyn, B.; Neiland, J.B.; Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

Sierra, S. A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganism and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*; **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.23, p.15-22, 1957.

Sreenivasan, J.; Sreenivasan, T.V. In vitro propagation of *Sclerostachya fusca* (Roxb) A cane hybrid. *Theoretical and Applied Genetics.*, 67, p. 171-174, 1984.

Stangarlin, J. R.; Kuhn, O. J.; Toledo, M. V.; Portz, R. L.; Schwan-Estrada, K R. F.; Pascholati, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis* v.10 n°1 p 18-46 2011.

ÚNICA - União da Indústria de Cana-de-acúcar. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=80>>. Acesso em 06/07/13.

Videira, S.S.; Araújo, J.L.S.; Baldani, V. L. D. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-luguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.

Yano, D.M.Y.; Attili, D.S.; Gatti, M.S.V.; Eguchi, S.Y.; Oliveira, U.M. Técnicas de microbiologia em controle de qualidade. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1991.