



Caracterização de *Bacillus* spp para promoção de crescimento e efeito na germinação de sementes de alface e cebola

Characterization of Bacillus spp for growth promotion and effect on germination of lettuce and onion seeds

Oliveira, Andréia Mara Rotta de¹; Büttow, Miriam Vallig¹; Silveira, Marilene B.¹; Lisboa, Bruno Brito¹; Volpiano, Camila Gazolla²; Vargas, Luciano Kayser¹

¹Secretaria da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul (SEAPDR-RS), Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, andreia-oliveira@agricultura.rs.gov.br;

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, gazollavolpiano@gmail.com

Eixo Temático: Manejo de Agroecossistemas de Base Ecológica

Resumo: Rizobactérias se caracterizam por apresentarem mecanismos de promoção de crescimento vegetal e tem sido bastante estudadas quanto ao potencial de uso em sistemas orgânicos de produção. Este estudo teve por objetivos caracterizar três isolados de *Bacillus* spp quanto à capacidade de produzir de ácido indol acético (AIA), sideróforos e de solubilizar fosfato, bem como avaliar efeito na germinação de sementes de alface e cebola. Todos os isolados produziram AIA, porém apenas o isolado TCR1 foi capaz de produzir sideróforos e solubilizar fosfato. O efeito positivo da inoculação das sementes, somente foi observado para a massa fresca de raiz de cebola, que foi superior ao controle. Não foram constatadas diferenças significativas para os demais parâmetros analisados.

Palavras chave: rizobactérias; ácido indol acético; sideróforos; solubilização de fosfato; hortaliças

Keywords: rhizobacteria; indole acetic acid; siderophores; phosphate solubilization; vegetables.

Introdução

O Brasil ocupa a 12^ª posição no mundo e a terceira na América Latina, em extensão de área destinada a agricultura orgânica e as hortaliças lideram entre os alimentos mais consumidos no país neste segmento (MAPA, 2019). Um dos desafios enfrentados para garantir a produção, está relacionado com os insumos destinados ao sistema orgânico, entre os quais os biofertilizantes, que irão garantir a nutrição equilibrada das plantas e um bom desempenho produtivo.

Nas últimas décadas, pesquisas para a seleção e identificação bactérias promotoras de crescimento vegetal, com potencial de uso como biofertilizantes, têm crescido no mundo todo. Essas bactérias se caracterizam por apresentarem mecanismos de produção de compostos indólicos e enzimas como a ACC-deaminase, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, fixação de nitrogênio, aumento da permeabilidade das raízes, estímulo à absorção de nutrientes e processos de proteção contra patógenos que promovem o desenvolvimento das plantas e contribuem para o aumento da produtividade (SOUZA et al., 2015).



O gênero *Bacillus* é um dos grupos taxonômicos que tem se destacado por apresentar mecanismos de promoção de crescimento vegetal e com grande potencial de uso em biofertilizantes, por ser mais tolerante a condições abióticas extremas, como variações bruscas de temperatura e pH, além da capacidade de competição com outros microrganismos (BENEDUZI, et al., 2008). Estirpes de diferentes espécies desse gênero vêm sendo estudadas na germinação de sementes e produção de mudas de diversas hortaliças, visando à produção orgânica (FLORENTINO et al., 2017).

Este estudo teve por objetivos caracterizar três isolados de *Bacillus* spp quanto à capacidade de produzir de ácido indol acético (AIA), sideróforos e de solubilizar fosfato. O efeito na germinação foi analisado através da inoculação dos isolados em sementes de alface e cebola.

Material e Métodos

Os três isolados utilizados neste estudo foram obtidos da rizosfera de plantas de tomate cultivadas no município de Caxias do Sul, RS e selecionados por terem mostrado grande efeito antagonista sobre isolados de *Fusarium* spp em estudos anteriores (SILVA et al., 2016). A análise dos parâmetros morfológicos, tintoriais, fisiológicos, bioquímicos e de caracteres coloniais, indicou que essas as bactérias pertencem ao gênero *Bacillus* ou correlatos e fazem parte da coleção do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (SEAPDR-RS).

Avaliação da Produção de ácido indol acético, sideróforos e capacidade de solubilizar fosfato:

A análise da produção de compostos indólicos (CIs) foram realizados de acordo com o método proposto por GLICKMANN & DESSAUX (1995). Os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e de comparação de médias ($p < 0,1$), utilizando o programa Assistat 7.7 Beta.

A detecção de sideróforos nos isolados foi realizada pelo método colorimétrico do CAS (Chrome Azurol- S) de acordo com SILVA-STENICO et al.(2005), que detecta a produção de sideróforo independentemente da sua estrutura química. Os resultados foram analisados pela observação visual da coloração, tendo sido considerados positivos para a produção de sideróforo os isolados que alteraram sua coloração de azul para laranja.

A avaliação da capacidade de bactérias em solubilizar fosfato inorgânico (CaHPO_4) *in vitro*, foi realizada segundo metodologia descrita por SANTOS et al. (2012). A análise foi qualitativa, sendo considerado a formação de halo translúcido a partir de 2 mm ao redor das colônias, resultado positivo para solubilização fosfato. O experimento foi realizado em triplicata.



Efeito dos isolados sobre a germinação de sementes de hortaliças: para este experimento foram selecionados três isolados que produziram ácido indol acético. Sementes de cebola e alface foram inoculadas com uma suspensão dos isolados TS38, TS41 e TCR1, preparada conforme metodologia proposta por MARIANO et al.(2000), ajustada para $OD_{600}=0,9$. Como tratamento controle, as sementes foram inoculadas com água. As condições experimentais e a avaliação da germinação de sementes foram realizadas de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). O delineamento experimental foi completamente casualizado e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e de comparação de médias ($p < 0,1$), utilizando o programa Assistat 7.7 Beta.

Identificação por PCR: A identificação dos isolados TS38, TS41 e TCR1 foi realizada através da análise das sequências parciais do 16S rRNA e *gyr B*, que foram comparadas com as sequências de estirpes tipo de *Bacillus* da base de dados do EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

Resultados e Discussão

Os isolados TCR1, TS41 e TS38, produziram 5,64 $\mu\text{g/ml}$, 10,17 $\mu\text{g/ml}$ e 13,91 $\mu\text{g/ml}$ de AIA, respectivamente (Tabela 1). Em relação à solubilização de fosfato e produção de sideróforos, apenas o isolado TCR1 foi positivo para estas características, nas condições experimentais realizadas (Tabela1). ZHAO, et al.(2015) caracterizaram 48 estirpes endofíticas de *Bacillus* e *Paenibacillus*, das quais somente 6 foi capaz de produzir sideróforos. Desta forma, o baixo índice constatado para essas características, entre os 35 isolados analisados nessa pesquisa, corrobora com os resultados obtidos por outros autores.

Quanto ao efeito dos isolados TS38, TS41 e TCR1 sobre a germinação de sementes de cebola e alface, não houve interação significativa da inoculação das sementes para cebola e, para a alface, o controle foi igual ou superior aos tratamentos com os isolados. Considerando a massa fresca da parte aérea, não houve interação significativa entre os isolados e as espécies de hortaliças, sendo que o controle foi superior aos tratamentos. Em relação à massa fresca de raiz, o efeito do tratamento das sementes de cebola com isolados foi superior ao controle (Tabela 1). HARTHMANN et al. (2009) também observaram que a microbiolização de rizobactérias em sementes de cebola pode promover respostas significativas. Porém, em nosso estudo, nesse mesmo parâmetro para a alface, o controle foi superior aos tratamentos com as bactérias. Os demais parâmetros, massa seca de raiz e de parte aérea, não foram significativos.

A análise genética dos isolados TS38, TS41 e TCR1 indicou que esses isolados pertencem ao grupo taxonômico dos *Bacillus*. O isolado TS38 teve homologia de 100% com *B. megaterium* e o TS38 99,7% com *B. amyloliquefaciens*. Não foi possível identificar o isolado TS41 em nível de espécie através das sequências analisadas.



Tabela 1. Produção de ácido indol acético (AIA), sideróforos (S), solubilização de fosfato (SF) e efeito de isolados de *Bacillus* spp sobre a produção de massa fresca de raiz (MFR) de cebola.

Isolado	Identificação	AIA µg/ml	S	SF	MFR
TCR1	<i>Bacillus megaterium</i>	5,64 c	+	+	252,9 a
TS38	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	13,91 a	-	-	248,2 a
TS41	<i>Bacillus</i> sp	10,17 b	-	-	180,3 ab
Controle	Água				102,7 b

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Conclusões

Todos os isolados de *Bacillus* spp analisados apresentam pelo menos um mecanismo relacionado a capacidade de promoção de crescimento vegetal. Considerando os parâmetros avaliados, os isolados TCR1, TS38 e TS41 não promoveram efeito significativo sobre a germinação de sementes e crescimento de alface e cebola.

Referências Bibliográficas

BENEDUZI, A. et al Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil, **Research in Microbiology**, 2008, v. 4, p. 244-250

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

FLORENTINO, V. et al. Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) **Revista colombiana de ciencias hortícolas** – 2017, v. 11, p 89-96.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Appl Environ Microbiol** 1995, v. 61: 793-796.

HARTHMANN, O.E.L. et al. Tratamento de sementes com rizobactérias na produção de cebola. **Ciência Rural**, 2009 v.39, p. 2533-2538.

MAPA, 2019 **Alimentos orgânicos renderam R\$ 4 bilhões a produtores brasileiros em 2018**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/mercado-brasileiro-de-organicos-fatura-r-4-bilhoes> Acesso em: 01 Junho 2019.



MARIANO, et al., Promoção de crescimento por bactérias. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). Manual de práticas em fitobacteriologia. Recife: Editora Universitária, 2000. p. 133-136.

SANTOS, I. B. et al Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-deaçúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, 2012 v. 28, Supplement 1, p. 142-149.

SILVA, V. M. et al Ação antagonista de *Bacillus* sp. no controle *in vitro* de *Fusarium* sp. isolado de tomateiro. In: IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada **Anais** 2016, Porto Alegre, 2016. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/resumos/bma/ocs/index.php/resumos/bma/resumos/IXSBMA/paper/view/119/165> Acesso em: 26 de junho 2019.

SILVA-STENICO, M.E. et al Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. **Microbiological Research** 2005, v.160, p.429-436.

SOUZA, R. et al Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, Dec. 2015.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572015000400401&lng=en&nrm=iso. Acesso em 1 de julho 2019

ZHAO L, et al Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. **Braz J Microbiol.** 2015, v. 46:977–989.