

FORMONONETINA E FÓSFORO NÃO AFETAM A DENSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ASSOCIATIVAS NA RIZOSFERA DE MILHO

Jessé Valentim dos Santos¹, Paula Rose de Almeida Ribeiro¹, Emanuely Silva Assis³, Isaac Carvalho Soares⁴, Fátima Maria de Souza Moreira⁵

¹Dr. em microcrobologia agrícola - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia -UFLA- Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG. Brasil.

²Dra em microbriologia agrícola- Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos, Departamento de Ciência do solo - UFLA - Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG. Brasil.

³Mestranda em Ciência do solo /UFLA – Univ.federal de Lavras

⁴Graduando em Agronomia – UFLA

⁵Professora Titular do Departamento de Ciência do Solo – UFLA.E-mail: fmoreira@dcs.ufla.br

Recebido em: 31/03/2015 – Aprovado em: 15/05/2015 – Publicado em: 01/06/2015

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de formononetina e de fósforo sobre a densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas na rizosfera de plantas de milho. Amostras da rizosfera de milho, foram coletadas em experimento em campo, sob diferentes doses de formononetina (0, 25, 50 e 100 g ha⁻¹), produto comercial PHC-506, na forma de pó (sal de potássio 7-hidroxi, 4'-metoxi-isoflavona), associadas a três doses de fósforo correspondentes a 0, 70 e 140 kg ha⁻¹ do P₂O₅, foram analisadas. Dez gramas de cada amostra de solo foi submetida a diluição seriada (10⁻¹ até 10⁻⁷), posteriormente alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em frascos de vidro contendo 15 mL de dois diferentes meios de cultura semissólidos (FAM e NFb). A densidade de bactérias foi determinada por meio do método do número mais provável (NMP), baseado na presença ou ausência de película formada próxima à superfície dos frascos após 15 dias de incubação a 28°C. Houve crescimento bacteriano com formação de películas nos dois meios. Os números de bactérias variaram de 4,5 x 10² a 5,7 x 10³ no meio FAM, e de 3,6 x 10³ a 4,8 x 10⁴ no meio NFb. Não houve diferença no número de bactérias entre os tratamentos, evidenciando que a formononetina não apresenta efeitos negativos sobre a densidade de bactérias diazotróficas associativas em milho. Também não houve influência das diferentes doses de fósforo sobre a densidade de bactérias associativas na rizosfera de milho.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias diazotróficas, fixação biológica de N₂, Isoflavonóide

FORMONONETIN AND PHOSPHORUS DO NOT AFFECT THE DENSITY OF ASSOCIATIVE NITROGEN FIXING BACTERIA IN THE RHIZOSPHERE OF MAIZE

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different doses of formononetin and phosphorus on the density of associative nitrogen fixing bacteria in

the rhizosphere of maize plants. Samples of maize rhizosphere were collected in field experiment under different doses of formononetin (0, 25, 50 and 100 g ha⁻¹), PHC-506 commercial product in powder form (the potassium salt of 7-hydroxy 4'-methoxy-isoflavone) associated with three doses of phosphorus (0, 70 and 140 kg ha⁻¹ of P₂O₅) were analyzed. Ten grams of each soil sample was subjected to serial dilution (10⁻¹ to 10⁻⁷). Aliquots (0.1 mL) were inoculated into glass vials containing 15 mL of two different semi-solid culture media (FAM and NFB). The density of bacteria was determined by the most probable number method (MPN), based on presence/absence of pellicle near the surface 15 days after incubation at 28 °C. There was bacterial growth, with the formation of pellicle, in both media. The number of bacteria ranged from 4.5 x 10² to 5.7 x 10³ in the FAM medium. In the NFB medium, it ranged from 3.6 x 10³ to 4.8 x 10⁴. There was no difference in the number of bacteria among treatments, showing that formononetin has no negative effects on the density of associative nitrogen fixing bacteria in maize. There was no influence of different doses of phosphorus on the density of associative bacteria in maize rhizosphere.

KEYWORDS: diazotrophic bacteria, biological N₂ fixation, isoflavonoid

INTRODUÇÃO

Dentre os organismos conhecidos, o grupo dos procariotos é o único a possuir representantes capazes de reduzir o N₂ à amônia. Os representantes capazes de realizar esse processo possuem a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N₂. Esses organismos são denominados diazotróficos e o processo biológico de conversão de N₂ à amônia recebe o nome de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MOREIRA et al., 2013a; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Estudos relacionados a FBN são importantes devido a relevância do processo como fonte de N em diversos ecossistemas naturais ou manejados (MOREIRA et al., 2010; TIKHONOVICH & PROVOROV, 2011; ZHAN & SUN, 2012). Comparativamente a FBN realizada pelas simbioses rizóbio-leguminosas, a fixação de N desempenhada pelas diazotróficas associativas é considerada menos eficiente (MOREIRA et al., 2013b). Entretanto, esse aspecto não inviabiliza os possíveis usos desses microrganismos na agricultura, uma vez que os fertilizantes nitrogenados elevam os custos de produção, e a demanda por alimentos cresce anualmente (MOREIRA et al., 2010; LARA et al., 2013).

Estimativas têm apontado que as bactérias associativas podem gerar acréscimos entre 20 e 30% na aquisição de N em gramíneas, incluindo-se o milho (MOREIRA et al., 2013b). Portanto, uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados poderá reduzir os custos na produção agrícola.

O milho é uma das culturas agrícolas mais importantes para o Brasil. No entanto, os gastos com fertilizantes nessa cultura resultam em um elevado custo de produção para o agricultor. No caso dos fertilizantes nitrogenados essa cultura foi responsável pelo segundo maior consumo (~900 mil toneladas) entre as culturas agrícolas em 2013 (INTL FCSTONE, 2013). Assim, há a necessidade de avanços em pesquisas com micro-organismos que vivem associados aos vegetais, os quais auxiliam na obtenção de nutrientes, diminuindo os custos e aumentando a produção (TAWARAYA et al., 2012; COZZOLINO et al., 2013).

A importância dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA), especialmente para o suprimento de fósforo às plantas, é bastante conhecida. A utilização do

isoflavonóide formononetina estimula a associação desses fungos com as raízes de plantas e consequentemente amplia a capacidade de absorção de elementos essenciais, especialmente P, podendo resultar em ganho de produtividade (NAIR et al., 1991; SIQUEIRA et al., 1991; SIQUEIRA et al., 1992; SILVA-JÚNIOR & SIQUEIRA, 1997). Assim o uso da formononetina pode reduzir a necessidade de adubação fosfatada. Embora esses estudos tenham enfatizado o potencial da formononetina como insumo biológico para uso na agricultura, não há relatos dos possíveis efeitos, positivos ou negativos, desse isoflavonóide sobre as bactérias associativas.

A introdução de substâncias estimulantes na agricultura exige informações sobre os efeitos em organismos de grupos funcionais chave, além daqueles que já são o alvo principal de sua ação. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da formononetina associada a doses de fósforo na densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas na rizosfera de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento de campo

O experimento foi conduzido em uma área de Latossolo Vermelho distrófico com textura argilosa pertencente à Universidade Federal de Lavras em Lavras, MG. (21°13' 27"Sul, 44° 58'19"Oeste e 920 m de altitude). A região é caracterizada por clima mesotérmico de inverno seco (Cwb), precipitação anual média de 1.411 mm e temperatura anual média de 19,3°C. Nessa área houve plantio de milho nos 10 anos anteriores. O solo apresentava pH (H₂O) 5,80; 4,9 mg dm⁻³ de P (Mehlich I); 125 mg dm⁻³ de K; 4,6 cmolc dm⁻³ de Ca; 0,4 cmolc dm⁻³ de Mg; 0,0 cmolc dm⁻³ de Al; 4,0 cmolc dm⁻³ de H+Al.

O experimento foi instalado em blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema fatorial 4 x 3, quatro doses de formononetina: 0, 25, 50 e 100 g ha⁻¹, (produto comercial PHC-506, sal de potássio 7-hidroxi, 4'-metoxi-isoflavona) e três doses de fósforo (P₂O₅): 0, 50 e 100%, de acordo com recomendação a partir da análise do solo. A formononetina foi aplicada às sementes antes da semeadura. As parcelas experimentais consistiram de quatro linhas de plantio, com espaçamentos de 0,80 m e comprimento de 6 metros. As amostras de solo foram coletadas apenas das duas linhas centrais. A cultivar de milho utilizada foi a GNZ 2004. De acordo com a necessidade da cultura tratamentos culturais e fitossanitários foram realizados. As doses de P₂O₅ aplicadas foram: 100% da recomendação (140 kg ha⁻¹), 50% da recomendação (70 kg ha⁻¹) e 0 na forma de MAP na formulação (10-54-00). Foram realizadas adubação de fundação, aplicado-se 40 Kg de N ha⁻¹ na forma de uréia, tomando-se o cuidado em descontar o N contido no MAP, e 80 Kg de K₂O na forma de KCl e 30 dias após, realizou-se adubação de cobertura, aplicando-se 135 Kg de N ha⁻¹ na forma de uréia, 90 Kg de K₂O ha⁻¹ na forma de KCl e 60 Kg ha⁻¹ de S na forma de sulfurgram (90% de S). A semeadura foi realizada em 26 de novembro de 2011.

Amostragem do solo

Amostras compostas por solo rizosférico de quatro plantas por parcela foram coletadas. Para isso, o sistema radicular do milho foi retirado e transferido para sacos plástico estéreis e agitado para o desprendimento das partículas de solo. Posteriormente todo o volume de solo obtido foi armazenado em sacos plástico e acondicionado sob refrigeração 4°C.

Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas associativas

A contagem de bactérias diazotróficas associativas foi realizada por estimativa do número mais provável. Para isto, amostras de solo foram submetidas à diluição seriada: 10 g de solo foram transferidos para Erlenmeyers contendo 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril, os quais foram agitados por 20 minutos a 120 rpm (diluição 10^{-1}). Desta diluição, 1 mL foi transferido para tubo de ensaio contendo 9 mL da solução salina, correspondendo a diluição 10^{-2} , esse processo foi repetido até que se obtivesse a diluição de 10^{-7} .

Dois meios de cultura semissólidos que favorecem espécies-alvo de bactérias diazotróficas foram utilizados (MOREIRA et al., 2013b). O meio FAM (termo original empregado pelos desenvolvedores do meio) cuja espécie-alvo é o *Azospirillum amazonense* (MAGALHÃES & DÖBEREINER 1984): 5 g Sacarose, 0,03 g K_2HPO_4 , 0,12 g KH_2PO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g NaCl, 4,0 mL FeEDTA (1,64%), 1 mL solução de vitaminas (10 mg biotina, 20 mg piridoxina, em 100 mL de água destilada estéril), 2 mL solução de micronutrientes (0,008 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,024 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,28 g H_3BO_3 , 0,2 g $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,263 g $MnSO_4 \cdot H_2O$ em 200 mL de água destilada), 1,75g ágar e 1000 mL de água destilada, pH 6,0; e o meio NFb (termo original empregado pelos desenvolvedores do meio) cujas espécies-alvo são os *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* e *A. halopraeferans* (DÖBEREINER et al. 1995): 5 g ácido málico, 0,6 K_2HPO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g NaCl, 0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 mL solução micronutrientes (0,008 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,024 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,28 g H_3BO_3 , 0,2 g $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,263 g $MnSO_4 \cdot H_2O$ em 200 mL de água destilada), 2 mL de solução de azul de bromotimol 0,5% em 0,2 N KOH, 4 mL FeEDTA (1,64%), 1 mL solução de vitaminas (10 mg biotina, 20 mg piridoxina, em 100 mL de água destilada estéril), 1000 mL com água destilada, 1,75 g de Agar, pH 6,5 ou 6,8.

Alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-1} até 10^{-7} foram inoculadas em cinco frascos de vidro, contendo 15 mL, de cada um dos meios de cultura. Os frascos foram incubados a 28°C por um período de até 15 dias, observando-se a formação (positivo) ou não (negativo) de película na superfície do meio de cultura. O número de frascos positivos e negativos foram quantificados e com auxílio de tabela própria foi determinado o NMP de bactérias diazotróficas associativas.

Isolamento e confirmação da capacidade fixadora de N dos isolados.

Uma porção do meio de cultura, juntamente com fragmentos da película, de cada frasco positivo, foi transferida para placa de petri contendo os meios de culturas FAM e NFb sólidos. Após crescimento das colônias procedeu-se novamente a re-inoculação em meios de culturas semissólidos para confirmação da capacidade de fixar N_2 por meio da formação de novas películas.

Análises estatísticas

Os dados foram transformados para Log de NMP e submetidos a análise variância e teste de média de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorrências de bactérias diazotróficas associativas, caracterizada pela formação de películas (Figura 1) na superfície dos meios de culturas, foram observadas em todos os tratamentos para os dois meios utilizados (FAM e NFb).

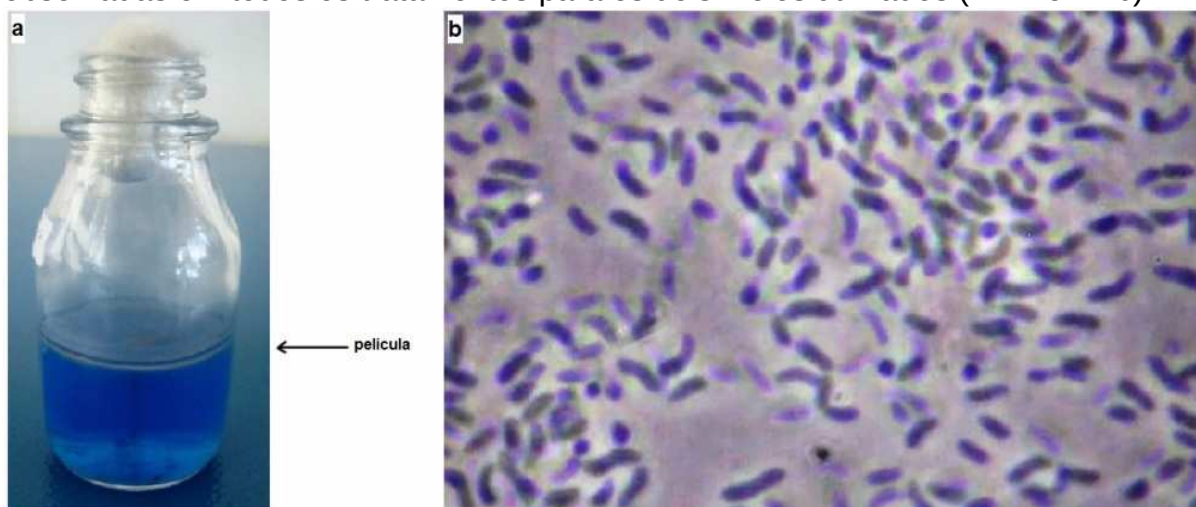


FIGURA 1 Bactérias diazotróficas associativas crescendo em meio semissólido (a) seta indicando a película na superfície do meio. (b) Bactérias diazotróficas vistas ao microscópio óptico em aumento de 1000x.

As densidades de bactérias diazotróficas associativas em ambos os meios de culturas não foram afetadas significativamente pelos níveis de P ou de formononetina (Tabela 1). As densidades bacterianas variaram de $4,5 \times 10^2$ a $5,7 \times 10^3$ no meio FAM, e de $3,6 \times 10^3$ a $4,8 \times 10^4$ no meio NFb, ambos foram considerados baixos. Valores na faixa de 10^6 - 10^7 células por g^{-1} de solo tem sido normalmente relatados (DÖBEREINER et al., 1995; MOREIRA et al. 2010). O número de bactérias diazotróficas no meio FAM foi superior ao observado por LANGE & MOREIRA (2002). Estes autores avaliaram a ocorrência de *A. amazonense* em diferentes espécies vegetais, e observaram NMP de 5×10^2 bactéria g^{-1} solo rizosférico de milho.

TABELA 1. Resumo das análises de variância para Log de NMP de bactérias diazotróficas associativas em dois meios de culturas (FAM e NFb), inoculados com solo rizosférico de milho cultivado em diferentes doses de formononetina associada a três níveis de P_2O_5 .

Fonte de Variação	GL	QM	
		FAM ¹	NFb ¹
Fósforo (P)	2	0,1109 ns ²	0,2833 ns
Formononetina	3	0,2106 ns	0,2635 ns
Bloco	3	0,6790 ns	0,5072 ns
Fósforo (P) x Formononetina	6	3292 ns	4338 ns
Erro	33	20,82	0,3429
CV (%)		19,37	15,73

¹ Meios de cultura para bactérias diazotróficas associativas, siglas originais empregadas pelos autores que elaboraram o meio; ²ns - não significativo, respectivamente pelo teste F

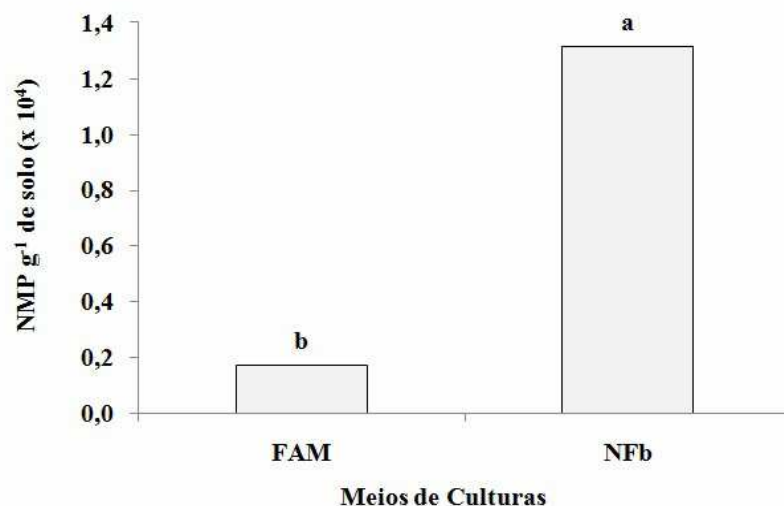


FIGURA 2 Densidade média de bactérias diazotróficas associativas (Número Mais Provável) em dois meios de culturas (FAM e NFb) inoculados com solo rizosférico de milho cultivado em diferentes doses de formononetina associada a três níveis de P_2O_5 . Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A contagem de bactérias no meio NFb foi cerca de 6,4 vezes ($P < 0,05$) maior do que no meio FAM (Figura 2). Essa densidade mais baixa verificada no meio FAM pode ser devido a maior especificidade desse meio comparativamente ao meio NFb. De fato, enquanto o meio FAM tem como espécie-alvo principal o *Azospirillum amazonense*, o meio NFb possui quatro espécies-alvo: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* e *A. halopraeferans* (DÖBEREINER et al., 1995; MOREIRA et al., 2013b), embora outras espécies de diazotróficas possam também crescer em ambos os meios (MOREIRA et al., 2013b).

As bactérias associativas fixadoras de N_2 colonizam o interior ou a superfície do tecido vegetal, folhas, caules, colmos e raízes (MOREIRA et al., 2013b). No presente estudo foi estimada a densidade das bactérias do solo da rizosfera do milho, portanto, é provável que isolamentos diretamente a partir das raízes apresentem população mais elevada. Testes adicionais podem ampliar a possibilidade de uso de estirpes de diazotróficas associativas como promotora do crescimento vegetal. De fato, diversos estudos têm relatado a capacidade dessas bactérias em sintetizar fitormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) e compostos de baixa massa molecular capazes de quelatar íons de ferro, denominados de sideróforos (ZHAN & SUN, 2012; MOREIRA et al., 2010). Outra característica importante também observada é a capacidade de solubilização de fosfatos (MOREIRA et al., 2013b; AHMED & KIBRET, 2014).

CONCLUSÕES

A formononetina não apresenta efeitos negativos sobre a densidade de bactérias diazotróficas associativas em milho.

A densidade de bactérias associativas não foi afetada pelas diferentes doses de fósforo.

AGRADECIMENTOS

Trabalho realizado com recursos do edital MCT/CNPq/CT-AGRO Nº 69/2009: Micro-organismos Facilitadores.

REFERÊNCIAS

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, v. 26, n.1, p. 1-20, 2014.

COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; PICCOLO, A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 129, n.1, p. 40-44, 2013.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

INTL FCSTONE. **Commodity Insight Maio de 2013**. Consumo de Macronutrientes (NPK) deve ser de 13,054 milhões de toneladas em 2013. [Acesso em: 3 mar. 2014]. Disponível em: <[http://www.intlfcstone.com.br/content/upload/arquivos/Consumo%20de%20Fertilizantes%20no%20Brasil\(1\).pdf](http://www.intlfcstone.com.br/content/upload/arquivos/Consumo%20de%20Fertilizantes%20no%20Brasil(1).pdf)>. 2013.

LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum Amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n.2, p. 529-533, 2002.

LARA, C.; ALVAREZ, A.; OVIEDO, L. E. Impacto de inoculación con la bacteria nativa *Azospirillum* sobre *Oryza sativa* L. en Córdoba-Colombia. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 11, n. 2, p. 37-45, 2013.

MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, v. 15, n.4, p. 246-252, 1984.

MOREIRA, F. M. S.; LIMA, A. S.; JESUS, E. C.; SILVA K.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A. Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que nodulam leguminosas. In: MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S. L. (eds). **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. Lavras: UFLA. Pp. 325-340. 2013a.

MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; SILVA K. Bactérias associativas: fixadoras de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S. L. (eds). **O ecossistema solo**: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. Lavras: UFLA. Pp. 341-350. 2013b.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n.2, p. 74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

NAIR, M. G.; SAFIR, G. N.; SIQUEIRA, J. O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n.2, p. 434-439, 1991.

SILVA-JÚNIOR, J. P.; SIQUEIRA, J. O. Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, n.1, p. 35-41, 1997.

SIQUEIRA, J. O.; BROWN, D. G.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. **Field application of the VA- mycorrhiza stimulating isoflavonoid formononetin (Rhizotropin TM) on corn and soybean in Brazil**. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MANAGEMENT OF MYCORRHIZAS IN AGRICULTURE, HORTICULTURE AND FORESTRY, Annals. Perth: University of Western Australia, 1992. Proceedings of... Perth, University of Western Australia. Pp.132.1992.

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, v. 118, n.1, p. 87-93, 1991.

TAWARAYA, K.; HIROSE, R.; WAGATSUMA, T. Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi can substantially reduce phosphate fertilizer application to *Allium fistulosum* L. and achieve marketable yield under field condition. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n.7, p. 839-843, 2012.

TIKHONOVICH, I. A.; PROVOROV, N. A. Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion. **Annals of Applied Biology**, v. 159, n.2, p. 155-168, 2011.

ZHAN, J.; SUN, Q. Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in the rhizosphere and non-rhizosphere of pioneer plants growing on wastelands of copper mine tailings. **Microbiological Research**, v. 167, n.3, p. 157-165, 2012.