

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SEMENTES DE DUAS CULTIVARES DE ARROZ IRRIGADO

DIAZOTROPHIC BACTERIA OCCURENCE IN SEEDS OF TWO WETLAND RICE CULTIVARS

Danni Maísa da Silva; Zaida Inês Antonioli; Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

Há possibilidade que populações de bactérias diazotróficas possam ser disseminadas pelas sementes do arroz irrigado. O objetivo do presente estudo foi quantificar as populações de bactérias diazotróficas que colonizam as sementes de uma cultivar tradicional (EEA-406) e de uma cultivar moderna (IRGA-419) de arroz irrigado. Para quantificação da população endofítica, sementes descascadas foram desinfetadas externamente, trituradas com solução salina e uma alíquota utilizada para inoculação do meio NFb semi-sólido, seletivo para bactérias diazotróficas, e do meio MR₂A sólido, usado para o cultivo das bactérias totais. Para quantificação da população epífita, as sementes descascadas foram lavadas em solução salina esterilizada e uma alíquota utilizada para inoculação nos mesmos meios. Bactérias diazotróficas ocorreram em elevado número tanto nas sementes da cultivar tradicional como da cultivar moderna de arroz irrigado. A população epífita foi maior que a população endofítica nas sementes das duas cultivares. Os resultados comprovam que as sementes de arroz irrigado se constituem em importante veículo de disseminação de bactérias diazotróficas.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, endofíticos, epífitas, meio NFb.

ABSTRACT

There is possibility that diazotrophic bacteria populations could be disseminated by rice seeds. The purpose of this study was to quantify the diazotrophic

bacteria population that colonize a traditional cultivar (EEA-406) and a modern cultivar (IRGA-419) seeds of wetland rice. For quantification of the endophytic population, shelled seeds were sterilized externally and crushed in saline solution. An aliquot was used for inoculation of the NFb semi-solid medium, selective for diazotrophs, and the MR₂A solid medium, used for the total bacteria cultivation. For quantification of epiphytic population, shelled seeds were washed in sterile saline solution and an aliquot used for inoculation in the same media. Diazotrophic bacteria occurred in high numbers in seeds of both traditional and modern rice cultivar. The epiphytic population was greater than the endophytic population in seeds of both cultivars. The results show that wetland rice seeds could be considered an important vehicle for diazotrophs dissemination.

Key words: *Oryza sativa*, endophytic, epiphytic, NFb medium.

O arroz é considerado o cereal mais importante do mundo por ser a fonte primária de alimentação da maioria da população mundial e o nitrogênio é o nutriente que apresenta a maior interferência nos componentes do rendimento desta cultura (LADHA & REDDY, 2003). O processo industrial de fixação do nitrogênio atmosférico é um grande consumidor de energia fóssil e o próprio adubo nitrogenado um poluente ambiental, sendo fundamental a busca de alternativas para a substituição, parcial ou total, deste adubo pelo nitrogênio fixado por bactérias diazotróficas (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004).

Bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* e *Burkholderia* são

¹ Eng. Agr., MSc., Extencionista da EMATER/RS.

² Bióloga, Dra., Professora do Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria.

³ Eng. Agr., Dr., Professor do Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria. *Autor para correspondência: Av. Roraima, 1000. CEP 97105-900. Santa Maria, RS. E-mail: rjsjacques@yahoo.com.br.

(Recebido para Publicação em 22/06/2009, Aprovado em 24/05/2010)

diazotróficas que são encontradas colonizando o solo, as raízes e os caules de plantas de arroz irrigado (RODRIGUES et al., 2006). Entre estes, o gênero mais estudado é o *Azospirillum*, que é uma rizobactéria promotora do crescimento de planta (PGPR), por estimular a síntese de fitohormônios e realizar fixação biológica do nitrogênio (FBN), podendo atuar ainda como agente de controle biológico de doenças (BASHAN & BASHAN, 2002). Inoculações com *Azospirillum* em condições de casa de vegetação incrementaram a produtividade do arroz irrigado em mais de 10% (RODRIGUES et al., 2008) e em condições de campo incrementos de aproximadamente 20% foram observados por PEDRAZA et al. (2009).

As sementes de arroz irrigado podem ser veículos de disseminação de doenças (MARCHEZAN et al., 2001), bem como disseminar e transferir geração após geração bactérias diazotróficas, resultando na dispersão destas bactérias entre lavouras. Apesar desta importância, poucos trabalhos na literatura buscaram determinar as populações de bactérias diazotróficas que colonizam as sementes do arroz (ELBELTAGY et al., 2000; VERMA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2008).

O objetivo do presente estudo foi quantificar as populações de bactérias diazotróficas que colonizam os tecidos internos (endofítica) ou a superfície externa (epífita) das sementes de uma cultivar tradicional (EEA-406) e uma cultivar moderna (IRGA-419) de arroz irrigado, visando verificar se estas sementes podem servir como veículos de disseminação de bactérias diazotróficas no solo.

Para determinação da população de bactérias diazotróficas e totais as sementes de arroz foram descascadas manualmente, pesadas e lavadas com água destilada esterilizada, em mesa de fluxo laminar. Após, foram lavadas em agitador mecânico do tipo Vortex, por 30 minutos em solução salina esterilizada (PBS 10:1) (BALANDREAU, 1997). Desta solução foi coletado 1,0 mL para a realização das diluições seriadas até 10^{-6} , para determinação da população de bactérias epífitas.

A quantificação da população de bactérias endofíticas se processou utilizando as sementes lavadas conforme descrito acima, que posteriormente foram colocadas em solução de NaOCl 5%, por 2 minutos, sendo novamente lavadas em água estéril por duas vezes (REINHOLD et al., 1986). A partir da água da última lavagem das sementes, foi retirado 1,0 mL e

efetuado o processo de diluição seriada até 10^{-6} para posterior inoculação nos meios de cultura, visando avaliar a eficiência da desinfecção (controle). Por fim, as sementes desinfetadas, foram maceradas em gral com solução salina esterilizada (PBS 10:1) e a partir daí 1,0 mL de solução foi coletado para a diluição seriada até 10^{-6} .

De cada tratamento descrito acima (epífitas, endofíticas e controle), 0,1 mL de cada nível das três diluições seriadas foram inoculados em três placas de Petri contendo meio de cultura M-R₂A (FRIES et al., 1994) para a determinação da população de bactérias totais. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por quatro dias até a contagem das unidades formadas de colônias. O mesmo volume das mesmas diluições também foi inoculado em tubo de ensaio contendo meio NFB semi-sólido, semi-seletivo para o crescimento de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, mas que também possibilita o crescimento de outros gêneros de bactérias diazotróficas (DÖBEREINER et al., 1995; JHA et al. 2009), perfazendo a quantidade de cinco tubos por nível de diluição. Os tubos de ensaio foram incubados em estufa a 30 °C por sete dias, quando se efetuou a contagem dos tubos com formação de película característica do crescimento de bactérias diazotróficas e estimou-se o número mais provável (NMP), de acordo com WOOMER (1994). As sementes de cinco plantas das cultivares tradicional e moderna foram utilizadas para a quantificação da população de bactérias, conforme descrito acima. Com os resultados das cinco plantas calculou-se a média, constituindo assim cinco repetições de cada tratamento.

A esterilização superficial das sementes de arroz foi muito eficiente, reduzindo em mais de 97% a população de bactérias epífitas (dados não apresentados), o que comprova que as populações obtidas após a maceração das sementes constituíram-se de bactérias endofíticas.

A população de bactérias diazotróficas foi elevada nas sementes das duas cultivares de arroz (Tabela 1), o que demonstra que as sementes se constituem em importante veículo de disseminação destas bactérias no solo. Os resultados obtidos assemelham-se aos obtidos por RODRIGUES et al. (2008), quando as cultivares de arroz irrigado IR-42 e IAC-4440 foram inoculadas com *A. amazonense* e a população desta bactéria foi determinada na semente.

Tabela 1 – População endofítica e epífita de bactérias diazotróficas e totais em sementes de uma cultivar tradicional (EEA-406) e de uma cultivar moderna (IRGA-419) de arroz irrigado.

Cultivar	População	Bactérias Diazotróficas		Bactérias Totais
		n ^o g ⁻¹ de semente ¹		
EEA-406	Epífita	4,90x10 ⁵	(88) ¹	3,09x10 ⁶
	Endofítica	4,90x10 ³	(79)	4,90x10 ⁴
IRGA-419	Epífita	1,66x10 ⁵	(87)	1,05x10 ⁶
	Endofítica	6,76x10 ²	(69)	1,29x10 ⁴

¹ Porcentagem da população de bactérias diazotróficas em relação às bactérias totais.

A ocorrência de bactérias diazotróficas nas sementes do arroz irrigado pode ser resultado da colonização endofítica destas bactérias desde o solo, migrando ascendentemente na planta e atingindo os tecidos aéreos. Em um trabalho com fotografias de microscópico *laser confocal* e *Sinorhizobium meliloti* geneticamente modificado, expressando a proteína verde fluorescente (*gfp*), observou-se um dinâmico processo de infecção de plantas de arroz por esta bactéria. A colonização iniciou-se pelo rizoplano, seguiu pelo interior da raiz e após estabeleceu uma migração ascendente pelo caule até as folhas, onde houve o desenvolvimento de uma população de 9×10^{10} células de rízbio por cm³ de tecido (CHI et al., 2005).

Não houve diferença entre a cultivar tradicional (EEA-406) e a cultivar moderna (IRGA-419) de arroz irrigado no que se refere às populações de bactérias diazotróficas, fossem elas endofíticas ou epífitas. Porém a população de bactérias epífitas foi numericamente superior a população de bactérias endofíticas, nas duas cultivares, para bactérias diazotróficas e totais (Tabela 1), indicando ser a superfície externa da semente o local preferencial de colonização destas bactérias, em relação aos tecidos internos da semente. VERMA et al. (2001) observaram que a população total de bactérias diazotróficas endofíticas variou de 1×10^5 a 1×10^6 em sementes de uma cultivar de arroz irrigado da Índia.

A população de bactérias diazotróficas representou 69% ou mais do total de bactérias presentes nas sementes. As porcentagens determinadas neste trabalho indicam a dominância da população diazotrófica na semente, mas por outro lado, o meio de cultura M-R₂A pode ter subestimado a população de bactérias totais. Assim, mais trabalhos se fazem necessários para se determinar a proporção de bactérias diazotróficas em relação a bactérias totais nos órgãos da planta colonizadas por estas bactérias.

Foi observado um elevado número de bactérias diazotróficas tanto nas sementes da cultivar tradicional (EEA-406) como da cultivar moderna (IRGA-419) de arroz irrigado, sendo que a superfície externa é o local preferencial de colonização, em relação aos tecidos internos da semente. Os resultados comprovam que as sementes de arroz irrigado se constituem em

importante veículo de disseminação de bactérias diazotróficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALANDREAU, J. The spermosphere model to select for plant growth promoting rhizobacteria. In: BARRAQUIO, W.L.; REVILLA, L.; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, n.1-2, p.15-24, 1997.

BASHAN, Y. & BASHAN, L.E. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.6, p.2637-2643, 2002.

CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P. et al. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.11, p.7271-7278, 2005.

CHOUDHURY, A.T.M.A. & KENNEDY, I.R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v.39, n.4, p.219-227. 2004.

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

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SUZUKI, H. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v.46, n.3, p.617-629, 2000.

FRIES, M.R.; ZHOU, J.H.; CHEESANFORD, J. et al. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of

habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.8, p.2802-2810, 1994.

JHA, B.; THAKURA, M. C.; GONTIAA, I.; ALBRECHTB, V.; STOFFELSB, M.; SCHMIDB, M.; HARTMANNB, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v.45, n.1, p.62-72, 2009.

LADHA, J.K. & REDDY, P.M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.252, n.1, p.151-167, 2003.

MARCHEZAN, E.; MENEZES, N.L.; SIQUEIRA, C.A. Controle da qualidade das sementes de arroz irrigado utilizadas em Santa Maria/RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.375-379, 2001.

PEDRAZA R.O.; BELLONE C.H.; BELLONE, S.C. et al. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v.45, n.1, p.36-43, 2009.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; NIEMANN, E.G. et al. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of kallar grass. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.3, p.520-526, 1986.

RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.275-284, 2006.

RODRIGUES, E.P.; RODRIGUES L.S.; OLIVEIRA A.L.M. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.302, n.1-2, p.249-261. 2008.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.91, n.2-3, p.127-141, 2001.

WOOMER, P. L. Most probable number counts. In: WEAVWER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDIECEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. **Methods of soil analysis**. Wisconsin: Soil Science Society American, 1994. Cap. 2, p. 59-79.