

Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) utilizando rizobactérias não autóctones

Growth promotion in corn (*Zea mays* L.) using non autochthonous rhizobacteria

Valdeir Alexandre Silva Junior¹, Eduardo Aguiar Barros Oliveira², Laís Belmudo Gregorio³,
Patricia Dayane Carvalho Schaker⁴

RESUMO

A utilização de rizobactérias é alternativa aos insumos agrícolas tradicionais como fertilizantes e agrotóxicos, devido aos seus mecanismos de promoção de crescimento vegetal e proteção contra estresses bióticos e abióticos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inoculação de rizobactérias previamente isoladas da rizosfera de Urucum e de pitanga no crescimento de milho. As linhagens selecionadas foram inoculadas de duas formas: via microbiolização ou diretamente no solo. Após o crescimento da planta, avaliou-se o comprimento do epicótilo, o peso fresco da parte aérea e da raiz, em comparação com plantas controle sem bactéria. Ainda, definiu-se o tempo ideal de cultivo da bactéria utilizando como critério a produção de auxina pela mesma. A quantificação de produção de auxina ocorreu ao longo de 72 horas, em células cultivadas na presença ou ausência de triptofano. O tratamento utilizando a linhagem LB02 pelo método da microbiolização obteve valores significativamente superiores de peso fresco da parte aérea e da raiz em comparação à inoculação no solo e controle. O cultivo da bactéria por 48 horas na presença de triptofano leva ao acúmulo maior de auxina. Assim, obteve-se resultados promissores, indicando que é possível utilizar linhagens não autóctones ao incremento do desenvolvimento vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: auxina, bioinsumos, microbiolização, rizobactérias.

ABSTRACT

The use of rhizobacteria is an alternative to traditional agricultural inputs such as fertilizers and pesticides, due to their mechanisms for promoting plant growth and protecting against biotic and abiotic stresses. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of inoculating rhizobacteria previously isolated from the rhizosphere of Urucum and pitanga on corn growth. The selected strains were inoculated in two ways: via microbiolization or directly into the soil. After plant growth, the length of the epicotyl and the fresh weight of the shoot and root were evaluated in comparison with control plants without bacteria. Furthermore, the ideal time for culturing the bacteria was defined using auxin production as a criterion. Quantification of auxin production occurred over 72 hours, in cells cultured in the presence or absence of tryptophan. The treatment using the LB02 strain by the microbiolization method obtained significantly higher values of fresh weight of the shoot and root compared to inoculation in the soil and control. Cultivating the bacteria for 48 hours in the presence of tryptophan leads to greater accumulation of auxin. Thus, promising results were obtained, indicating that it is possible to use non-indigenous strains to increase plant development.

KEYWORDS: auxin, bioinputs, microbiolization, rhizobacteria.

¹ Voluntário. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: valdeirjunior@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6529900556064148.

² Bolsista da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: eoliveira.2001@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 9674682418436293

³ Voluntária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: laisbelmudo@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 1132337525788966

⁴ Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: patriciaschaker@utfpr.edu.br. ID Lattes: 9674682418436293.

INTRODUÇÃO

Estudos apontam que até o ano de 2050, a população mundial terá um crescimento de 35%; em consequência, a produção agrícola deverá crescer em cerca de 60% quando comparada a produção atual. Nas últimas quatro décadas, a produção agrícola brasileira se desenvolveu e transformou o Brasil em uma das principais potências mundiais do setor. O agronegócio é responsável por cerca da metade das exportações brasileiras, com destaque à produção e comercialização de milho, café, açúcar, soja em grão e algodão (GAZZONI, 2017). Em 2022, o agronegócio obteve retorno de US\$ 159,09 bilhões, o que correspondeu a 47,6% do total das exportações brasileiras (BRASIL, 2023). Apesar do evidente desenvolvimento da agricultura nacional, muitos desses resultados foram obtidos mediante ao emprego de agrotóxicos para controle de fitopatógenos e pragas, como também de fertilizantes químicos para promoção de crescimento vegetal (CASTRO, 2019).

Tendo em vista esse cenário, a utilização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs) têm se tornado uma importante alternativa aos insumos agrícolas tradicionais. As RPCPs podem atuar por meio de mecanismos que influenciam diretamente a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e de fitohormônios como citocininas, giberelinas, etileno e ácido indol acético (VELLOSO *et. al.*, 2019). Também podem agir por mecanismos indiretos como anabiose, competição, promoção de resistência (SILVA *et al.*, 2022).

Nesse sentido, as RPCPs podem ser usadas em diversas atividades, tais como: biofertilizantes, fitoestimuladoras, rizomediadoras e biopesticidas. Também podem ser aplicadas para tratamento de sementes, mudas micropropagadas; bem como na incorporação direta ao substrato de cultivo; no tratamento de tubérculos, raízes e estacas; na pulverizações de partes aéreas como folhagem, flores e frutos; em pós-colheita (MARIANO *et. al.*, 2004).

Rizosfera é a região no qual as RPCPs são encontradas. Trata-se de uma fração do solo que circunda a raiz com 1 a 3 mm de diâmetro e que se encontra sob influência direta do sistema radicular, onde há grande número de atividades relacionadas com microrganismos. Neste microambiente, as raízes das plantas absorvem nutrientes, água e liberam metabólitos vegetais, conhecidos como exsudatos. Essas condições propiciam ambiente favorável às interações entre plantas e microrganismos, recrutando-os à região, de modo que os compostos exsudatos são usados como fonte de energia e nutrientes por eles. Em consequência, quando comparada com solo a granel, a rizosfera apresenta uma grande diversidade de microrganismos, das quais destacam-se as RPCPs (PEREIRA *et. al.*, 2020; HERMANN-BANDERA *et. al.*, 2022; SILVA *et. al.*, 2022).

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo inocular suspensões bacterianas de isolados da rizosfera em sementes de milho para posterior análise de parâmetros relacionados à promoção de crescimento em plantas.

MATERIAIS E MÉTODOS

As linhagens microbianas utilizadas foram *Bacillus* sp. LB02, isolado da rizosfera de *Bixa orellana* (urucum) e *Bacillus* sp. 32, isolado da rizosfera de *Eugenia uniflora* L. (pitanga). Ambos pertencem à coleção de microrganismos da UTFPR-TD. Essas



linhagens foram selecionadas pois obtiveram resultados promissores em análises bioquímicas realizadas *in vitro* (BIET, 2021; SERATTI, 2021).

Para preparo do pré inóculo, transferiu-se, isoladamente, as linhagens LB02 e 32 para 10 ml de meio de cultivo TBS (Tryptona Soy Broth), acrescido de triptofano (100 mg/mL), incubando-se no escuro a 35° C, 150 rpm por 24 horas. Para preparo do inóculo, utilizou-se 10% v/v do pré-inóculo no mesmo meio de cultivo e condições de cultivo. Após a incubação, mediu-se a densidade óptica (OD₆₀₀) da suspensão bacteriana em espectrofotômetro. O isolado 32 obteve OD₆₀₀=1,8±0,04 e o isolado LB02 obteve OD₆₀₀=1,7±0,03.

Foram utilizados dois métodos de aplicação das bactérias para avaliação do seu efeito no crescimento de milho híbrido: 1) microbiolização de sementes pré-germinadas e 2) diretamente no solo. Na microbiolização, as sementes foram submersas por 30 minutos nos respectivos inóculos e semeadas em vasos contendo 300 gramas de substrato da marca Humusfértil. Na segunda metodologia, 1 mL da suspensão bacteriana foi adicionada sob as sementes pré-germinadas colocadas previamente nos vasos no primeiro dia e no sétimo dia de semeadura. Em seguida, completou-se o volume do vaso com substrato. As plantas foram mantidas em fotoperíodo 16/8 por 14 dias com regas periódicas.

Após os 14 dias, foram realizadas as seguintes análises: tamanho da epicótilo (cm), massa fresca (g) da parte aérea e raiz e massa seca (g) da parte aérea e raiz. Para determinação da massa seca, as plantas foram mantidas em estufa a 50° C até que se atingisse massa seca constante.

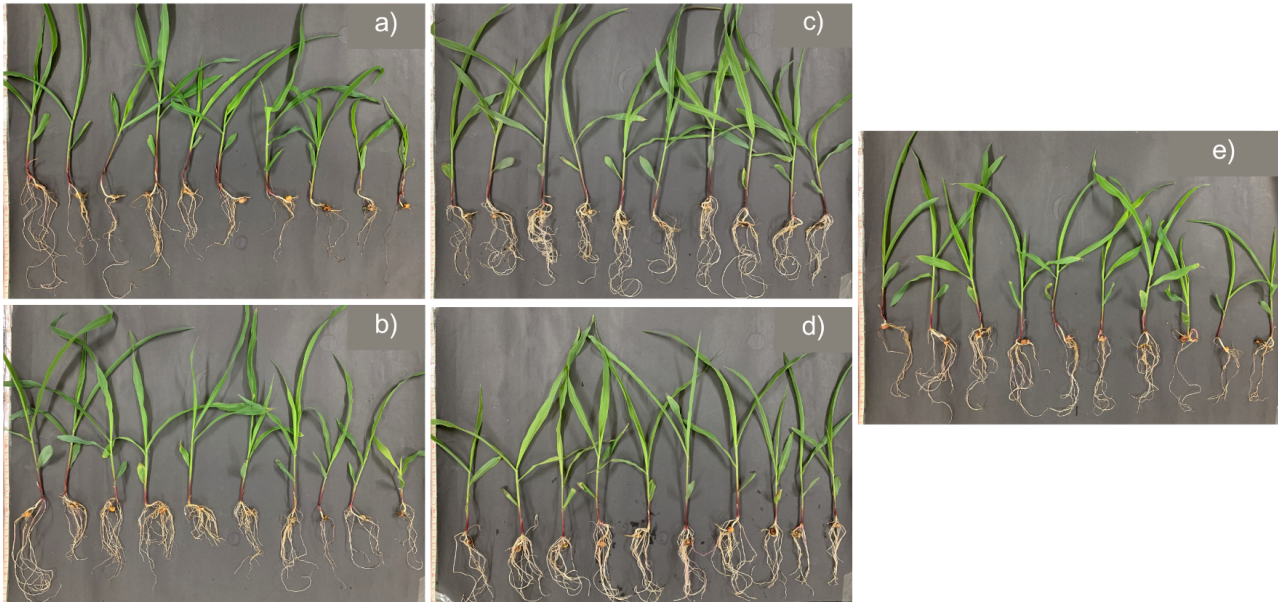
A fim de analisar o melhor tempo de crescimento do inóculo bacteriano, foi realizada a quantificação de auxina ao longo do tempo para o isolado LB02. A linhagem foi multiplicada em meio TBS para obtenção do pré-inóculo por 24 horas à 35°C e 150 rpm. O inóculo foi preparado usando 10% v/v do pré-inóculo, em meio TBS suplementado com triptofano (100 mg/mL), mantido no escuro, a 35°C, a 150 rpm por 72 horas. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas para quantificação de auxina utilizando o Reagente de Salkowski em espectrofotômetro a 520 nm. A concentração de AIA foi determinada por meio da comparação com a curva padrão de concentrações conhecidas (5, 10, 25, 50, 100 µg/mL) do hormônio sintetizado (Sigma).

Todos os dados coletados foram obtidos em triplicata, e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância com auxílio do software OriginPro versão 2019.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

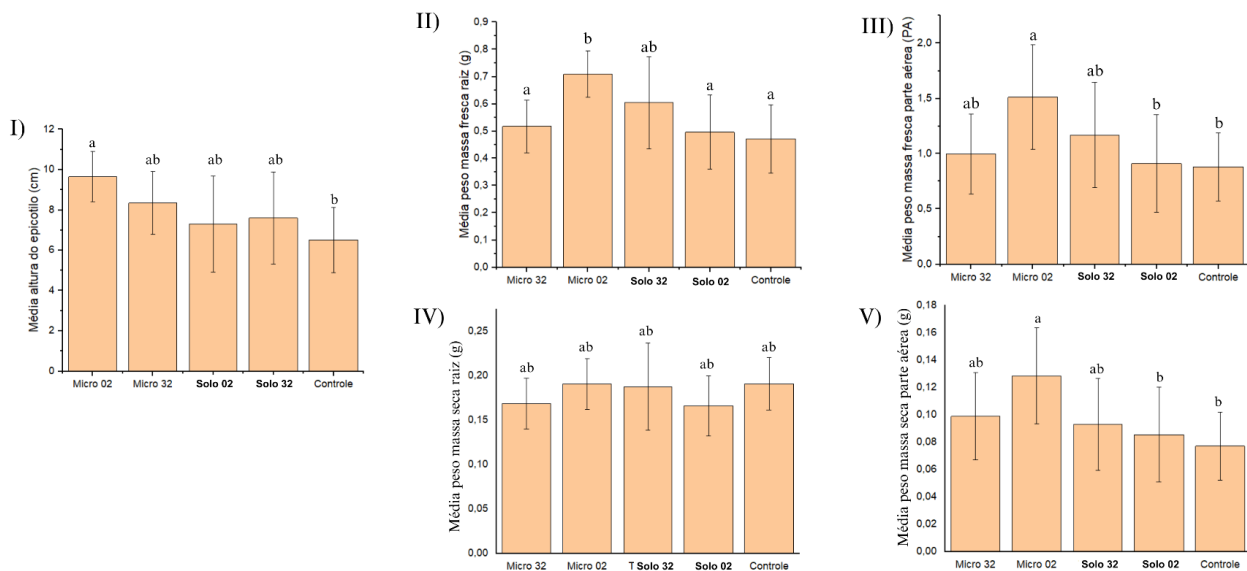
Na análise da promoção de crescimento em plantas de milho, pode-se observar diferenças significativas ($p < 0.05$) na altura da parte aérea das plantas inoculadas, independente da linhagem utilizada ou do método de inoculação (Figura 1, Gráfico 1), sendo que a técnica de microbiolização utilizando a linhagem *Bacillus* sp. LB02 obteve melhores resultados.

Figura 1 - Comparativo visual entre os tratamentos: a) Solo inoculado com *Bacillus* sp. LB02; b) Solo inoculado com *Bacillus* sp. 32; c) Microbiolização com a linhagem *Bacillus* sp. LB02; d) Microbiolização com a linhagem *Bacillus* sp. 32; e) Controle.



Fonte: Autoria própria (2023).

Gráfico 1 - Altura das plantas inoculadas (I); Peso fresco da raiz e da parte aérea (II e III, respectivamente); e peso seco da raiz e da parte aérea (IV e V respectivamente) com bactérias promotoras de crescimento *Bacillus* sp. LB02 e *Bacillus* sp. 32 utilizando diferentes métodos. As letras indicam médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autoria própria (2023).

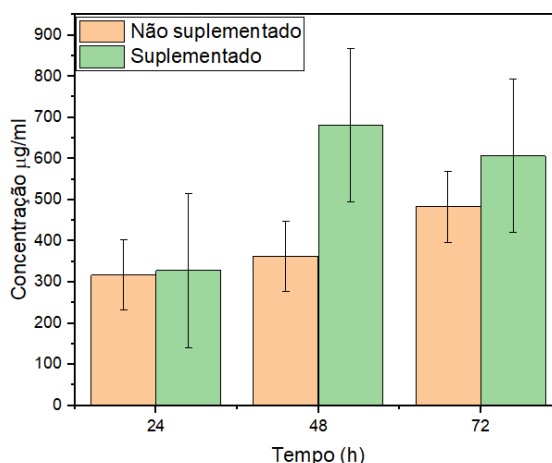
Em relação ao peso fresco (Gráfico 1: II e III) e seco (Gráfico 1: IV e V) tanto da parte aérea quanto da raiz, os tratamentos que receberam a linhagem *Bacillus* sp. 32 não diferiram significativamente do controle, em nenhum dos métodos de inoculação

utilizados. Por outro lado, a linhagem *Bacillus* sp. LB02 obteve, pelo método da microbiolização, valores significativamente mais elevados ($p < 0,05$) de peso fresco tanto da parte aérea quanto da raiz (1,15 g e 0,71 g, respectivamente), em comparação com o tratamento por inoculação no solo (0,91 g e 0,5 g) e controle (0,88 g e 0,47 g). Com isso, obteve-se resultados promissores, o que indica ser possível utilizar linhagens não autóctones ao desenvolvimento vegetal.

O melhor desempenho do método da microbiolização quando comparado ao método de inoculação no solo pode ser explicado porque a microbiolização das sementes promove resistência à semente, o que culmina no vigor da plântula; também estimula emergência rápida em razão da produção de fitormônios como auxinas, giberelinas e citocininas (IBANHES NETO et al., 2021; JUNGES et al., 2016).

A avaliação em triplicata da produção de auxina no tempo de 24, 48 e 72 horas de incubação possibilitou determinar o melhor tempo de sintetização da auxina pela bactéria LB02, que apresentou melhores efeitos no crescimento vegetal. Conforme observado no Gráfico 2, o tempo de 48 horas apresentou melhor média para produção de auxina com suplementação de triptofano (682,32 mg/mL), portanto, essas condições devem ser utilizadas para o preparo de inoculantes utilizando esta linhagem.

Gráfico 2 - Quantificação da produção de auxina pela linhagem *Bacillus* sp. LB02 em 24, 48 e 72 horas de crescimento em meio TSB com e sem suplementação de triptofano.



Fonte: Autoria própria (2023).

CONCLUSÃO

As linhagens microbianas apresentam potencial de promoção do crescimento microbiano em ensaios in vivo, sendo que o método de microbiolização mostrou-se mais eficiente. Para preparo dos microrganismos para inoculação sugere-se utilizar o período de crescimento por 48 horas, utilizando o triptofano como indutor, a fim de maximizar o conteúdo da auxina, proporcionando um melhor desenvolvimento radicular.

Agradecimentos

Agradeço a UTFPR pelo apoio financeiro e estrutura para realização dos experimentos.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BANHES NETO, H. F. et al. Physiological potential of green bean seeds treated with *Bacillus subtilis*. **Journal of Seed Science**, v. 43, p. 1–12, 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Comércio Exterior**: Exportações do agronegócio fecham 2022 com US\$ 159 bilhões em vendas. 17 jan. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/exportacoes-do-agronegocio-fecham-2022-com-us-159-bilhoes-em-vendas>. Acesso em: 01 set. 2023.

CASTRO, Jefferson Pereira da Silva *et al.* Alternativas sustentáveis ao uso intensivo de agrotóxicos na agricultura brasileira. **Revista Grifos**, v. 28, n. 47, p. 121-144, 2019.

GAZZONI, Decio Luiz. Como alimentar 10 bilhões de cidadãos na década de 2050?. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 4, p. 33-38, 2017.

HERMANN-BANDERA, Aniéli Altmeyer *et al.* Rizosfera no sistema de plantio direto de hortaliças: uma revisão narrativa. 2022.

JUNGES, E. et al. Biopriming in bean seeds. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 66, n. 3, p. 207–214, 2016.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos *et al.* Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, v. 1, p. 89-111, 2004.

PEREIRA, Leanne Teles *et al.* Efeitos de rizobactérias na promoção de crescimento e controle de fitopatógenos em sementes de paricá. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 5, p. 539-548, 2020.

SILVA, Mariana Aguiar *et al.* Rizobactérias multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e3111426971-e3111426971, 2022.

VELLOSO, Camila Cristina Vieira *et al.* Resposta diferencial de genótipos de milho à inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas. **Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo**, 2019.