

## Notas Científicas

### Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas

Patrícia Marluci da Conceição<sup>(1)</sup>, Henrique Duarte Vieira<sup>(1)</sup>, Luciano Pasqualoto Canellas<sup>(2)</sup>, Roberto Batista Marques Júnior<sup>(2)</sup> e Fábio Lopes Olivares<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Laboratório de Fitotecnia, Avenida Alberto Lamego, 2.000, Parque Califórnia, CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: patymarluci@yahoo.com.br, henrique@uenf.br <sup>(2)</sup>UENF, Laboratório de Solos. E-mail: canellas@uenf.br, robertobmjr@yahoo.com.br <sup>(3)</sup>UENF, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual. E-mail: fabioliv@uenf.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos (AH), bactérias diazotróficas endofíticas e o uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas, na estimulação do crescimento vegetal e na população de bactérias estabelecidas na planta hospedeira. A adição de AH, bactérias e o uso em conjunto estimularam o crescimento vegetal. Os AH utilizados no recobrimento de sementes de milho têm menor capacidade de estimular o crescimento radicular, em comparação ao uso em solução. O recobrimento de sementes é uma opção de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Z67).

Termos para indexação: *Herbaspirillum seropedicae*, *Zea mays*, bioestimulantes, calcário.

### Corn seed coating with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of seed coating of maize with humic acid (HA), endophytic diazotrophic bacteria, and the combination of both, on plant growth stimulation and bacteria population establishment in roots of inoculated plant host. The addition of HA, bacteria, and the combined use of bacteria and HA stimulated plant growth. Humic acids used in the coated seed formulation show diminished capacity for stimulation of root growth compared with its use in solution. Seed coat is an option for inoculation of endophytic diazotrophic bacteria like *Herbaspirillum seropedicae* (Z67).

Index terms: *Herbaspirillum seropedicae*, *Zea mays*, biostimulation, lime.

Os ácidos húmicos (AH) podem atuar no aumento da população de bactérias diazotróficas, introduzidas na planta e, conseqüentemente incrementar efeitos benéficos sobre a planta hospedeira (Marques Júnior, 2006). Isso pode ser explicado como parte dos efeitos dos AH em promover o crescimento vegetal, pelo maior enraizamento e aumento do número de sítios mitóticos, aliado à maior emergência de raízes laterais, o que aumenta o número de pontos de colonização para as bactérias.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos (AH), bactérias diazotróficas endofíticas e uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas (*Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67), na

estimulação do crescimento vegetal e na população de bactérias estabelecidas na planta hospedeira.

As avaliações foram realizadas no Setor de Produção e Tecnologia de Sementes da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ. Foi utilizada a estirpe de *H. seropedicae* Z67 (BR 11175), proveniente da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, no Município de Seropédica, RJ. Para a preparação do inóculo para recobrimento, uma colônia do isolado da estirpe foi inoculada em meio DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986), e permaneceu em agitação a 150 rpm por 24 horas a 30°C. Uma alíquota de 30 µL da cultura crescida foi transferida para frascos de vidro (volume 12 mL), com 5 mL de meio JNFb semi-sólido (Baldani

et al., 1992). Os frascos foram incubados para o crescimento e formação da película, por 72 horas a 30°C. Em parte dos frascos de vidro, houve adição de AH isolado de vermicomposto, na concentração de 40 mg L<sup>-1</sup>.

O recobrimento das sementes de milho (UENF 506-8) foi realizado com a mistura de 70% (p/p) de calcário, 10% (p/p) de meio de cultura semi-sólido JNFb e 20% (p/p) de água destilada. Foram adicionados a essa mistura 2% de agente cimentante (cola à base de acetato de polivinila). Os tratamentos avaliados foram: T1, sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido (controle); T2, sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH; T3, sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + bactérias; T4, sementes recobertas com meio de cultura JNFb semi-sólido + AH + bactérias. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados provenientes das avaliações foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Foram realizadas as seguintes avaliações: teste de germinação (Brasil, 1992), com oito repetições de 25 sementes; massa de matéria fresca da raiz e parte aérea, em que dez plântulas obtidas do teste de germinação foram seccionadas, tendo-se separado a raiz da parte aérea; massa de matéria seca da raiz e parte aérea, em que as raízes e parte aérea das plântulas foram colocadas em sacos de papel e levadas para estufa de ventilação forçada de ar, regulada a 60°C por 72 horas e, em seguida, foram pesadas; comprimento e área radicular, em que os segmentos radiculares de dez plântulas de cada tratamento foram obtidos do teste de germinação. Os segmentos radiculares foram escaneados, e as imagens foram salvas em arquivos de extensão TIFF e analisadas com auxílio do programa Delta-T scan Cambridge. A contagem de bactérias foi realizada com as plântulas obtidas do teste de germinação, pela técnica do número mais provável (NMP) estimado pela formação de película típica no meio JNFb, tendo-se usado a tabela McCrady para três repetições por diluição (Döbereiner et al., 1995).

Os resultados de germinação das sementes recobertas mostraram que a inoculação da bactéria *H. seropedicae* Z67 e a adição de AH, em sementes de milho recobertas, não afetaram a germinação das sementes (Tabela 1).

A adição de ácidos húmicos (AH), a inoculação de bactérias e o uso em conjunto (BacAH) aumentaram, respectivamente, em 34, 38 e 26% a massa de matéria fresca das raízes, em relação ao controle (Tabela 1). Em relação ao acúmulo de massa de matéria fresca da parte aérea, pode-se observar que a adição de AH, a inoculação de bactérias e o uso em conjunto BacAH aumentaram, significativamente, o desenvolvimento da parte aérea em relação ao controle. A adição de AH, inoculação de bactérias e o uso em conjunto de BacAH não estimularam significativamente o aumento da massa de matéria seca da raiz e da parte aérea. Verificou-se uma discrepância entre a massa de matéria fresca da parte aérea e raiz, em relação à massa de matéria seca da parte aérea e raiz, o que indica que o estímulo verificado no crescimento das plantas pode ser atribuído à ação dos ácidos húmicos e bactérias sobre o alongamento celular por turgescência vacuolar, o que não causa efeito significativo sobre a massa de matéria seca, em pequeno intervalo de avaliação.

O crescimento radicular ocorre em dois estádios: o crescimento meristemático e o crescimento vacuolado. O crescimento vacuolado, que ocorre na zona de alongamento, é caracterizado por uma rápida expansão celular, sustentada pelo aumento da captação de água pelos vacúolos via pressão de turgor (Cosgrove, 2000). Segundo Mirza et al. (2001), as bactérias diazotróficas endofíticas produzem hormônios que são capazes de promover o crescimento e alterações na geometria do sistema radicular, o que resulta numa absorção mais eficiente de água e nutrientes. Zandonadi et al. (2006) observaram forte estímulo no bombeamento de H<sup>+</sup> pelas V-ATPase e H<sup>+</sup>pirofosfatase vacuolares, induzidos por AH isolados de várias fontes de matéria orgânica.

**Tabela 1.** Germinação de sementes de milho recobertas, massa de matéria fresca e seca de raiz e parte aérea de plântulas de milho (UENF 506-8) aos sete dias, oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias (Bact), ácidos húmicos (AH) e o uso em conjunto de bactérias e AH<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Germinação (%)	Matéria fresca (mg por planta)		Matéria seca (mg por planta)	
		Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Controle	94a	322,7b	431,4b	35,7a	39,3a
Meio + AH	94a	433,2a	538,7a	42,4a	45,1a
Meio + bactéria	95a	446,6a	606,7a	43,8a	47,8a
Meio + AH + Bact	96a	406,7ab	543,1a	38,6a	43,8a
CV (%)	8,84	23,35	18,94	24,8	20,5

<sup>(1)</sup>Médias, em cada coluna, seguidas por letras iguais, não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

O aumento na atividade das bombas vacuolares é compatível com o maior aumento observado na massa de matéria fresca das raízes. O aumento do gradiente de  $H^+$ , gerado pelas bombas de  $H^+$ , implica na ativação dos transportadores secundários de íons, o que promove sua entrada na célula e posterior acúmulo no vacúolo e geração da pressão osmótica, que possibilita a entrada de água (Maurel & Chrispeels, 2001).

Não foi observada alteração na área radicular (Tabela 2); isto pode ser explicado pela ausência de substrato e baixa eficiência das raízes em absorver água do papel germiteste. No entanto, a adição de AH, a inoculação de bactérias e o uso em conjunto BacAH aumentaram, respectivamente, em 27, 44 e 33% o comprimento radicular das plântulas (Tabela 2). Resultados superiores foram relatados por Marques Júnior (2006), que observou incremento de 154, 79 e 161%, nos tratamentos com AH, bactérias e uso em conjunto BacAH, respectivamente, em plântulas de milho germinadas em papel germiteste e expostas, durante cinco dias, à solução com AH e bactérias.

O efeito dos AH sobre o desenvolvimento vegetal pode ser alterado se utilizado em estado sólido ou em solução. A maior parte dos experimentos que utilizam AH como promotores de crescimento é realizada com soluções de AH, tais como o de Marques Júnior (2006), o que explica os resultados mais expressivos obtidos por esse autor.

O efeito fisiológico dos AH, ou pelo menos parte dele, está relacionado à presença de estruturas químicas semelhantes à dos hormônios vegetais. Piccolo (2001) postulou que, diferentemente de uma macromolécula de elevada massa molecular, os AH consistem de uma reunião de várias unidades estruturais de massa relativamente pequena, que são estabilizadas por interações fracas, principalmente hidrofóbicas perto da

neutralidade, e por pontes de  $H^+$  em pH ácido. Assim, em solução, os AH podem liberar pequenas estruturas de sua conformação, em resposta a variações no meios tais como exsudação das plantas; no entanto, no estado sólido, é esperada uma diminuição dessa possibilidade de alteração da conformação molecular dos AH, em razão do aumento das forças de interação e da baixa solubilidade do material húmico em água. Assim, é possível que unidades estruturais portadoras de atividade biológica e que estejam em estado sólido não apresentem a mesma atividade química que em solução.

A contagem do número de bactérias diazotróficas associadas às raízes apresentou aumento significativo no número de bactérias, nos tratamentos com adição de bactérias, AH e uso em conjunto de BacAH, em relação ao controle (Tabela 2). Ao se analisarem os resultados, verificou-se que os AH não interferiram negativamente no crescimento de microrganismos endofíticos, como observado por Marques Júnior (2006); além disso, foi verificado forte estímulo na colonização das bactérias diazotróficas em presença de AH, mesmo em plantas sem inoculações, o que indica ação sobre a população microbiana nativa. Os efeitos da aplicação de AH podem ser evidenciados pelo incremento da população diazotrófica nativa, em duas unidades logarítmicas, em relação ao controle. A inoculação com *H. seropedicae* (Z67) provocou incremento de quatro unidades logarítmicas, em relação ao controle. O efeito da aplicação conjunta sobre o incremento da população não foi aditivo nas condições avaliadas.

O recobrimento de sementes se mostra como opção de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas, da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), para garantir a sobrevivência dessas bactérias, no recobrimento, até a emissão das raízes pelas plantas. A adição de AH, bactéria e o uso conjunto estimularam o crescimento vegetal. Os AH estimularam a colonização da microbiota nativa. Novas pesquisas devem ser realizadas, para estudar outras concentrações de AH, mais adequadas ao fornecimento na forma sólida em recobrimento de sementes, bem como tratamento adicional para aumentar sua disponibilidade.

**Tabela 2.** Área radicular (AR), comprimento radicular (CR) e contagem do número de bactérias diazotróficas (CNBD), em raízes de plântulas de milho (UENF 506-8) aos sete dias, oriundas de sementes recobertas com adição de bactérias (Bact), ácidos húmicos (AH) e o uso em conjunto de bactérias e AH<sup>(1)</sup>.

Tratamento	AR (mm <sup>2</sup> )	CR (cm)	CNBD (log <sup>-1</sup> g)
Controle	402,77a	671,37b	2,40c
Meio + AH	427,71a	856,2ab	4,73b
Meio + bactéria	425,56a	971,22a	6,65a
Meio + AH +Bact	426,56a	891,85a	6,70a
CV(%)	13,08	26,59	6,46

<sup>(1)</sup>Médias, em cada coluna, seguidas por letras iguais, não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

## Referências

- BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, v.13, p.65-73, 1992.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- COSGROVE, D.J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.109-124, 2000.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-Cnpab, 1995. 60p.
- MARQUES JÚNIOR, R.B. **Potencial do uso combinado de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas para bioestimulação de plantas**. 2006. 88p. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- MAUREL, C.; CHRISPEELS, M.J. Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. **Plant Physiology**, v.125, p.135-138, 2001.
- MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, v.237, p.47-54, 2001.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, v.166, p.810-832, 2001.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Suma Phytopathologica**, v.12, p.16, 1986.
- ZANDONADI, D.B.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. **Planta**, v.225, p.1583-1595, 2006.

---

Recebido em 1<sup>o</sup> de novembro de 2007 e aprovado em 11 de abril de 2008