

Aspectos fisiológicos e moleculares da fotossíntese em plantas de milho inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae*

Luiz Eduardo Souza da Silva Irineu¹

Priscila Pires Bittencourt²

Cleiton de Paula Soares³

Mariana de Souza Freitas⁴

Fabio Lopes Olivares⁵

Agroecologia e Produção Agrícola Sustentável

Resumo

Bactérias promotoras do crescimento vegetal são consideradas uma solução promissora para uma agricultura mais ecológica e sustentável. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de *Herbaspirillum seropedicae* sobre as taxas fotossintéticas, teor de clorofila e genes relacionados à maquinaria fotossintética. Para isso foram utilizadas plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* e após cinco dias foram realizadas análises de trocas gasosas (absorção líquida de CO₂, condutância estomática e transpiração), fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de clorofila e expressão gênica relacionada ao aparato fotossintético. Nossos dados revelaram que a inoculação promove o crescimento de plantas de milho nos primeiros dias de desenvolvimento e acúmulo de matéria seca da parte aérea e da raiz. Além disso, a inoculação aumenta os teores de clorofila. No entanto, nenhuma alteração marcante foi observada para os dados de trocas gasosas. Dados de expressão gênica indicaram que há uma maior mudança no perfil transcricional de genes relacionados à maquinaria fotossintética, sugerindo que aumento da expressão desse gene pode estar relacionado com o aumento da taxa de transporte de elétrons. Em conjunto, os dados obtidos revelam que plantas de milho inoculadas um melhor preparo do aparato fotossintético, além de promover o crescimento das plantas e aumentar a produtividade.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, Agricultura sustentável, Milho, BPCV, Fotossíntese.

¹Doutorando em Biotecnologia Vegetal; Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro; luizeduardobio@outlook.com

²Doutoranda em Biotecnologia Vegetal; Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro; pribpires@gmail.com.

³Mestranda em Biotecnologia Vegetal; Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro; fs.mariana@yahoo.com.br.

⁴Pós-Doutorando, Dr. em Biotecnologia Vegetal; Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro; cleiton_depaula@yahoo.com.br.

⁵Prof. Dr. em Agronomia; Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro; fabioliv@uenf.br.

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e econômico após a Segunda Guerra Mundial fez aumentar a demanda por alimentos e matérias-primas em todo o mundo. Com o objetivo de acabar com a fome, houve um aumento expressivo nas áreas de produção agrícola e utilização do pacote tecnológico da agricultura moderna disponível na época. Atribui-se então a essa mudança o título de Revolução Verde (MORAGAS, SCHENEIDER, 2003).

Desde então, a produção agrícola brasileira vem crescendo de tal forma que se destaca por sua participação na produção agrícola mundial. Dados da “Food and Agriculture Organization of United Nations” (FAO) demonstram que a produção de cereais brasileira cresceu de 15.036.353 milhões de toneladas em 1961 para 84.128.482 milhões de toneladas em 2016 (FAOSTAT, 2018). Em 2017, as exportações agrícolas brasileiras totalizaram US\$ 96,1 bilhões, representando um crescimento de 13% ao arrecadado no ano anterior (MAPA, 2018).

Porém, o aumento da produção agrícola demanda aumento do consumo de fertilizantes e pesticidas (TILMAN et al., 2002). Com isso, a demanda de fertilizantes no Brasil está em constante crescimento, com o uso de 1.834.733 e 2.634.552 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, respectivamente em 2002, e incrementos de 365% para N-fertilizante e 401% para P-fertilizante em 2016 (FAOSTAT, 2018).

Neste cenário, o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) tem se destacado como uma potencial alternativa para diminuir o impacto ambiental negativo resultante do uso contínuo de produtos químicos, uma vez que estes organismos podem ser utilizados para melhorar o crescimento e o rendimento das culturas.

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio da subclasse β -Proteobacteria que se associa preferencialmente à plantas da família Poaceae de grande importância econômica e alimentar como forrageiras, trigo, milho, cana-de-açúcar, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1986; OLIVARES et al., 1996). A associação de *H. seropedicae* com as plantas é benéfica, este micro-organismo é capaz de fornecer nitrogênio de forma assimilável para a planta hospedeira, o que resulta na promoção do

crescimento e no aumento da produção (BALDANI et al., 2000). Além disso, *H. seropedicae* é capaz de produzir hormônios reguladores do crescimento e solubilizar e disponibilizar fósforo inorgânico para as plantas (BASTIÁN et al., 1998; ESTRADA et al., 2013).

Estudos com *H. seropedicae* demonstraram que quando inoculado, induziu crescimento, aumento na acumulação de nitrogênio nas culturas de cana-de-açúcar, arroz e milho (OLIVEIRA et al., 2002; GYANESHWAR et al., 2002; ALVES, 2007). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que os hormônios secretados por BPCV afetam a excreção e regulação hormonal, afetando diretamente os tecidos responsáveis pela fotossíntese, incrementando acúmulo de massa (BATTISTUS, 2015). Com isso, a bactéria *H. seropedicae* vem sendo utilizada na concepção de produtos e processos microbianos e formulação de bioinoculantes a fim de promover o crescimento vegetal e incremento da produção agrícola com a possível diminuição do uso de insumos químicos.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de *H. seropedicae* sobre as taxas fotossintéticas, teor de clorofila e genes relacionados à maquinaria fotossintética em plantas de milho.

METODOLOGIA

A bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 (SisGen nº AFD1CAD) foi crescida de uma colônia pura em meio DYGS líquido (RODRIGUES NETO et al., 1986) por 24 horas a 30°C em shaker orbital a 150rpm. Após crescimento 20µL foi transferido para o meio JNFB líquido (DÖBEREINER et al., 1995) e mantido em crescimento por 48 horas sob as mesmas condições anteriores. Após crescimento as células bacterianas foram sedimentadas por centrifugação (5.000g por 5min) e ressuspensas em água estéril na densidade celular de 4×10^9 cfu.ml⁻¹.

Sementes de milho (Dekalb 7815) foram desinfestadas e germinadas durante 72 horas em câmara B.O.D. Após a germinação, plântulas com raiz de 2,5cm foram selecionadas e dispostas em potes de 2L contendo solução de CaCl₂ a 0,2M. Plantas

tratadas foram inoculadas com 20mL do inóculo contendo 2×10^7 células mL^{-1} de *H. seropedicae*. Plantas controle não receberam inoculação. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 28°C , fotoperíodo de 16/8h e aeração com bomba de aquário.

Após cinco dias de crescimento a absorção líquida de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram determinadas usando IRGA sob condições controladas de CO_2 (380ppm CO_2), densidade de fluxo de fótons $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura da câmara de 25°C em 10 plantas de cada tratamento.

A fluorescência da clorofila *a* foi mensurada utilizando fluorímetro portátil. Para os valores de fluorescência mínimos (F_o) e máxima (F_m) as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos e depois saturadas com um pulso de luz ($3000 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 1s). A eficiência quântica máxima do PSII (fotossistema II) adaptada ao escuro (F_v/F_m), taxa de transporte de elétrons (ETR) foram estimados de acordo com Maxwell and Johnson (2000). O índice de verde foi medido via SPAD.

Discos foliares foram coletados para quantificação dos teores de pigmentos fotossintéticos, pesado e colocados em frascos contendo 10ml de dimetilsulfóxido, armazenados protegidos da luz entre 2°C e 5°C por 24 horas. Posteriormente levados ao banho-maria durante 6 horas a 64°C e lidas em espectrofotômetro de absorbância, nos comprimentos de onda: 665nm (clorofila *a*), 649nm (clorofila *b*) e 480nm (carotenoides). Os valores obtidos foram expressos em concentração de pigmentos segundo as equações propostas por WELLBURN (1994).

Plantas foram coletadas em triplicatas para determinação da massa fresca e seca. Folhas das plantas dos dois tratamentos tiveram o RNA extraído com RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) para análise da expressão gênica por PCR em tempo real. Primers para os genes: light-harvesting complex 1 (LHC1), oxygen-evolving enhancer protein 1 (*PsbO_1*) e cytochrome *b6f* complex iron-sulfur subunit (*b6f*) foram desenhados e utilizados em reações de qPCR em Tempo Real nas concentrações de 500nM, usando $7,5 \mu\text{L}$ de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) sob as condições: 40 ciclos 95°C por 1min, 60°C por 1min e 72°C por 1min. O gene β -tubulina foi empregado como normalizador. Todas as corridas foram realizadas em triplicata. A quantificação relativa foi determinada

de acordo com o método 2^{-DDCt} (Livak e Schmittgen, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação com *H. seropedicae* HRC54 foi capaz de promover o crescimento das plantas de milho após os cinco dias de desenvolvimento, quando comparadas com as plantas não inoculadas. Houve incremento 166,7% da massa fresca da parte aérea e 242% da massa fresca da raiz. Enquanto para a massa seca, houve incremento de 188% da massa da parte aérea e 73% da massa seca da raiz (Figura 1).

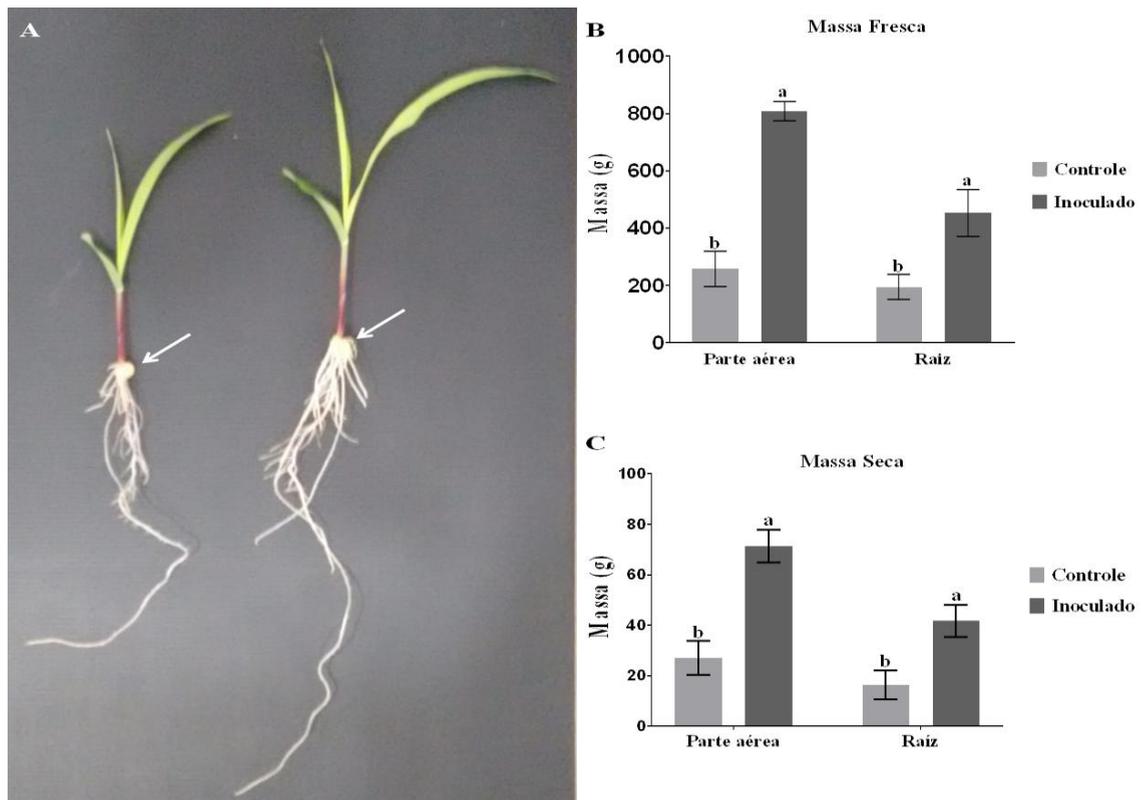


Figura 1: (A) Crescimento após 5 dia de inoculação de 2×10^7 células por ml^{-1} de *H. seropedicae* HRC54 em milho variedade Dekalb 7815. As setas mostram as sementes que ainda estavam presentes. (B) Aumento da massa fresca de raiz e parte aérea. (C) Aumento da massa seca de raiz e parte aérea. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Tukey $p > 0.05$).

A quantificação de pigmentos fotossintéticos demonstrou que plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* após cinco dias possuem conteúdo de clorofila *a* aumentado quando comparado com plantas não inoculadas. No entanto, não apresentaram diferenças significativas quando observados o conteúdo de clorofila *b* e carotenoides (Figura 2A). Contudo, o conteúdo total de clorofila (*a+b*) foi maior nas plantas inoculadas. Além disso, o índice de verde medido pelo SPAD foi maior nas plantas inoculadas com *H. seropedicae* HRC54 (Figura 2B).

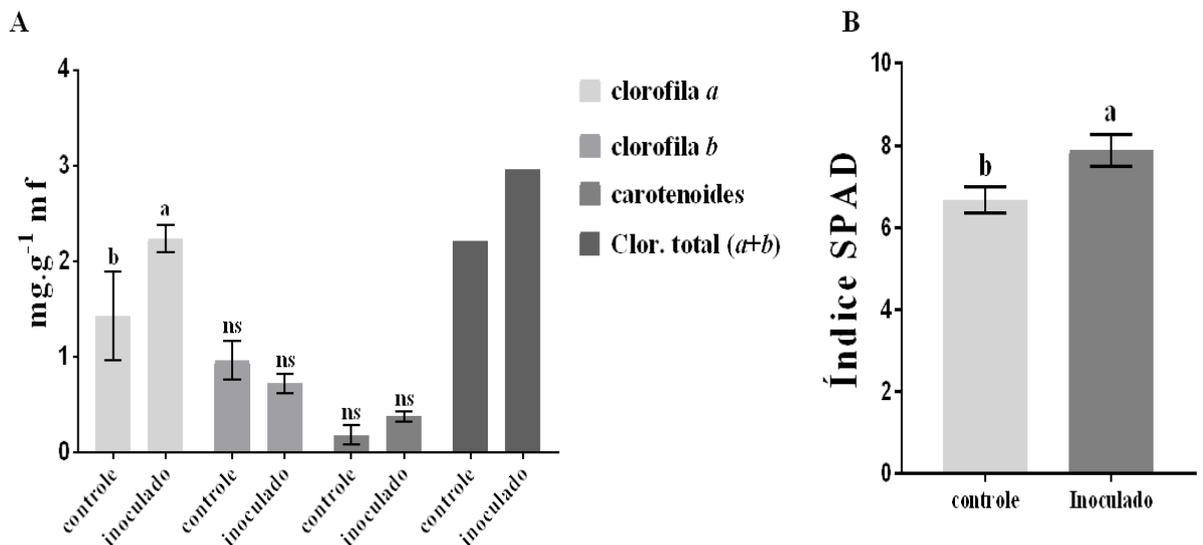


Figura 2: (A) Conteúdo de clorofila de plantas controle e inoculadas. (B) Intensidade de verde (conteúdo de clorofila via SPAD) Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Tukey $p > 0.05$) e ns= não significante estatisticamente.

Entre plantas inoculadas e não inoculadas não houve diferença em relação aos parâmetros de trocas gasosas e a razão F_v/F_m . Curiosamente, plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram uma maior taxa de transporte de elétrons (ETR) quando comparadas com plantas de milho não inoculadas (Tabela 1), sugerindo que a inoculação afetou significativamente o transporte de elétrons lineares dentro dos cloroplastos.

Tabela 1: Dados de fluorescência da clorofila *a* e IRGA. Resultados em negrito indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Tukey $p > 0.05$)

	Controle	Inoculado
Fv/Fm	0,774 ± 0,006639	0,771 ± 0,003946
ETR	2871 ± 94,69	3279 ± 56,69
<i>E</i> (mmol m ⁻² s ⁻¹)	0,242 ± 0,039	0,4669 ± 0,053
<i>gs</i> (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,016 ± 0,0014	0,019 ± 0,002
<i>A</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	2,72 ± 1,20	3,6788 ± 0,951

A análise de RT-qPCR mostrou que a inoculação impactou significativamente a expressão relativa dos genes LHC1, *PsbO1* e *b6f*, sendo estes expressos 4,36, 7,33 e 10,45 vezes mais, respectivamente (Figura 3). O gene normalizador β -tubulina foi utilizado como controle e este apresentou níveis de expressão constante entre plantas controle e inoculadas.

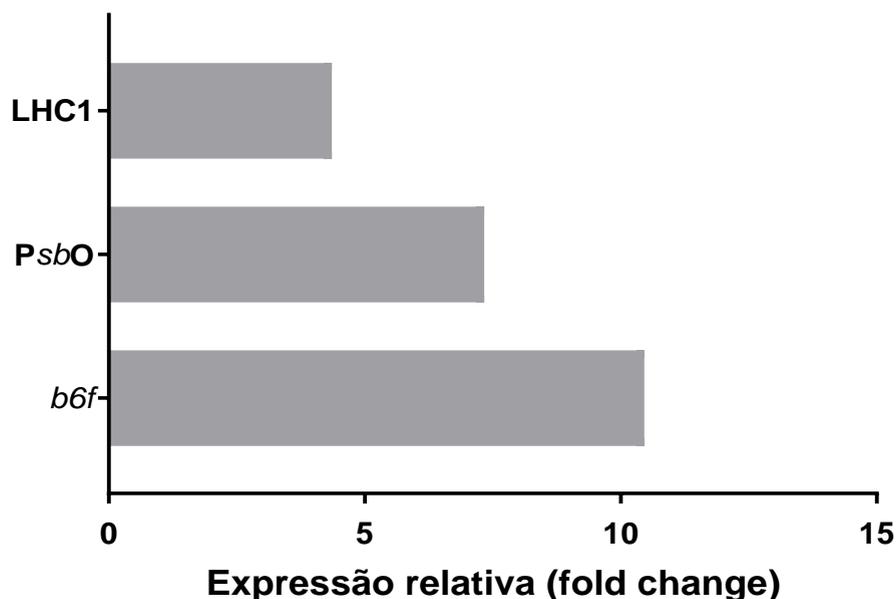


Figura 3: Expressão de genes referentes ao aparato fotossintético: light-harvesting complex 1 (LHC1), oxygen-evolving enhancer protein 1 (*PsbO_1*) e cytochrome *b6f* complex iron-sulfur subunit (*b6f*).

O fotossistema II de plantas superiores é composto por um complexo central (CCII) e um complexo coletor de luz (LHC) ou complexo antena. O complexo CCII é formado por 14 polipeptídios (*PsbA-PsbP*), onde o *PsbO* é uma proteína extrínseca de 33kDa e denominada como liberadora de oxigênio através da reação de divisão da água, além de ter papel central na estabilização do manganês no complexo proteico (TAIZ et al., 2017; MURAKAMI et al., 2002).

O gene LHC1 codifica a proteína chlorophyll *a-b* binding 2, que compõem o complexo coletor de luz dos fotossistemas, onde aproximadamente 60% de toda a clorofila da planta está ligada (ANDERSSON et al., 2003). É o complexo mais abundante na membrana do tilacóide, onde tem a importante função de coleta e transferência da energia luminosa, sendo essencial para a regulação e distribuição da energia de excitação dentro do aparato fotossintético (ANDERSSON e ANDERSSON, 1988).

O citrocromo *b₆f* é um complexo proteico responsável pela transferência de elétrons e prótons provenientes do fotossistema II. O gene cytochrome *b₆f* complex iron-sulfur subunit codifica a proteína Rieske ferro-sulfurosa, onde dois átomos de ferro estão ligados em uma ponte por dois íons sulfetos (TAIZ et al., 2017). Interessantemente, o aumento da expressão desse gene pode estar correlacionado com o aumento da taxa de transporte de elétrons (ETR) das plantas inoculadas.

Análises de proteômica realizados por Leandro et al. (2019) demonstraram que proteínas relacionadas ao aparato fotossintético foram mais sintetizadas em plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *H. seropedicae* após 28 dias, reforçando a ideia de que a inoculação com *H. seropedicae* pode promover o desenvolvimento do aparato fotossintético de plantas.

Assim como demonstrado por Canelas et al. (2013) o conteúdo de clorofila (índice SPAD) e clorofila total foram aumentados nas plantas inoculadas com *H. seropedicae*. Curiosamente, nossos resultados também apresentaram maior índice de clorofila e isso pode ser correlacionado à fixação de nitrogênio promovida naturalmente por *H. seropedicae*. O teor de clorofila na folha pode ser utilizado para prever o nível nutricional de nitrogênio em plantas, pois a quantidade desse pigmento correlaciona-se positivamente com teor de N (Booij et al., 2000). Além disso, o aumento dos teores de clorofila em

função de doses de N foram observados por Araújo et al. (2016) em plantas de milho.

É importante destacar que as plantas analisadas estavam com cinco dias de desenvolvimento não sendo dependentes da fotossíntese para produção de energia, pois ainda possuem a semente como fonte de reserva. Contudo, Canelas et al. (2013) demonstraram que a inoculação de *H. seropedicae* foi capaz de aumentar as taxas fotossintéticas (E , gs e A) e conteúdo de clorofila em plantas de milho com 45 dias.

De acordo com nossos achados, plantas de milho inoculadas com a bactéria promotora do crescimento vegetal *H. seropedicae* tendem a apresentar uma modulação positiva de genes referente ao aparato fotossintético, o que pode sugerir um aumento da fotossíntese dessas plantas. Portanto, uma investigação mais detalhada é necessária para esclarecer essa questão, contribuindo para que o uso de bioinoculantes possa ajudar na redução dos impactos causados pelo uso de insumos agrícolas.

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que a inoculação de plantas de milho com *H. seropedicae* teve importantes efeitos na promoção do crescimento, com aumento da biomassa vegetal. *Herbaspirillum seropedicae* aumentou os pigmentos fotossintéticos e a taxa de transporte de elétrons. No entanto, não foi capaz de alterar as taxas fotossintéticas de plantas de milho com cinco dias de desenvolvimento, mas plantas de milho inoculadas apresentaram um melhor preparo do aparato fotossintético.

A AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Newton Foundation, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo auxílio financeiro concedido à pesquisa.

R REFERÊNCIAS

- ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- ANDERSON, J. M. Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 37, p.93-136, 1986.
- ANDERSSON, J. Absence of the LHCB1 and LHCB2 proteins of the light-harvesting complex of the photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. **The Plant Journal.** v. 35, p.350-361, 2003.
- ARAÚJO, E. O., et al. Doses de nitrogênio e inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho em condições de solo fértil. **Acta Agronômica**, v.65, n.1, p.16-23, 2016.
- BALDANI, J. I., et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, V. L. D., et al. Inoculation of Rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol.Fertil.Soils** n.30, p.485–491, 2000.
- BASTIÁN, F., et al Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, n.24, p.7–11, 1998.
- BATTISTUS, A. G. **Inoculação via semente e foliar de *Azospirillum brasilense* associado ao tratamento de sementes com bioativador na cultura do milho.** Dissertação de Mestrado. 96f. Marechal Cândido Rondon: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2015.
- BOOIJ, R.; VALENZUELA, J.L.; E AGUILERA, C.. *Determination of crop nitrogen status using non-invasive methods.* In: Haverkort, A.J.; Mackerron, D.K.L. (Eds.). *Management of nitrogen and water in potato production.* The Netherlands, Wageningen Pers, p. 72–82. 2000.

CANELLAS, L. P., et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil**. v.366 p.119–132, 2013.

DÖBEREINER, J.; et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI: Seropédica: Embrapa- CNPAB, 1995. 60 p.

ESTRADA, G. A., et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant Soil**. n.369, p.115–129, 2013.

FAOSTAT. Cereal Total Production. Disponível em:
<<http://www.fao.org/faostat/en/#country/21>> Acesso em: 01 de agosto de 2019.

FAOSTAT. Input, Fertilizers consumption in nutrients. Disponível em:
<<http://www.fao.org/faostat/en/#country/21>> Acesso em: 01 de agosto de 2019.

GYANESHWAR, P., et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**, v. 245, n. 1, p. 83-93, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods**. n.4, p.402-408, 2001.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N.. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of experimental botany**. v. 51, p.659-68, 2000.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Superavit de US\$ 81,86 bilhões do agronegócio foi o segundo maior da história. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/noticias/superavit-de-us-81-86-bilhoes-do-agronegocio-foi-o-segundo-maior-da-historia>> Acesso em: 01 de agosto de 2019.

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**. v.3, n.10, p.26-40, 2003.

MURAKAMI, R. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant with impaired *PsbO*, one of two genes encoding extrinsic 33-kDa proteins in photosystem II. **FEBS Letters**. v.523, p.138-142, 2002.

OLIVARES, F. L., et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**. n. 2, p.197–200, 1996.

OLIVEIRA, A. L. M., et al. The effect of inoculating endophytic N₂ –fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and soil**. n. 242, p.205-215, 2002.

RODRIGUES NETO, J., MALAVOLTA JR., V. A., VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 2, p.16, 1986.

TAIZ, L., et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6 ed, Porto Alegre, Artmed, 2017.

TILMAN, D., et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v.418, p.671-677, 2002.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant. Physiol.** v.144, p.307-313, 1994.