

AValiação DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Sapindus saponaria* L. PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Victória Batista Figueiredo da Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Leonardo Hamamura Alves, Rodrigo Pawloski Shoffen (Uem), Andressa Domingos Polli (Uem), João Arthur dos Santos de Oliveira (Uem), João Alencar Pamphile (Orientador), e-mail: japamphile@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia celular / Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Multidisciplinar, Biotecnologia.

Palavras-chave: Micro-organismos endofíticos. Fixação de nitrogênio. Peso seco.

Resumo:

Os micro-organismos endofíticos podem promover o crescimento vegetal por meio da solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, produção de fito-hormônios, entre outros. Neste trabalho buscamos avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) *in vitro* de cinco linhagens de bactérias endofíticas SS23 (*Staphylococcus hominis*), SS92 (*Enterococcus casseliflavus*), SS30 (*Staphylococcus* sp.), SS59 (*Enterococcus mundtii*) e SS121 (*Kocuria* sp.), isoladas de *Sapindus saponaria* L., bem como verificar a atividade promotora de crescimento vegetal em mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em condições de casa de vegetação. A FBN foi avaliada empregando meio semissólido sem a presença de nitrogênio. A promoção do crescimento vegetal dos cinco endófitos ocorreu após 25 dias da inoculação nas sementes de feijão, avaliando-se número de folhas, altura, comprimento da raiz e biomassa seca. Em meio semissólido, todas as bactérias endofíticas apresentaram a formação da película, sugerindo a capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Para os parâmetros biométricos, não foram observados valores estatisticamente significativos para número de folhas, altura e comprimento das raízes. A linhagem SS92 (*E. casseliflavus*) destacou-se para peso seco (9,6 g) quando comparado com os demais endófitos e o controle sem inoculação (7,3 g). O emprego de micro-organismos, especialmente os endófitos, como biofertilizantes é de extrema valia, uma vez que estes podem exercer função semelhantes aos fertilizantes químicos, entretanto, sem efeitos adversos para o meio ambiente.

Introdução:

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado um alimento muito importante em diversos países (MCCONELL et al., 2010). Neste sentido, o emprego de micro-organismos que proporcionem um aumento no rendimento em sua produção podem ser favoráveis no âmbito socioeconômico atual. Os micro-organismos endofíticos podem promover o crescimento vegetal por meio de inúmeros mecanismos, como a solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, produção de fito-hormônios, entre outros (PASSARI et al., 2016).

As bactérias SS23 (*Staphylococcus hominis*), SS92 (*Enterococcus casseliflavus*), SS30 (*Staphylococcus* sp.), SS59 (*Enterococcus mundtii*) e SS121 (*Kocuria* sp.) foram isoladas como endófitos da planta medicinal *Sapindus saponaria* L. (GARCIA, 2015). Estas bactérias demonstraram ser capazes de solubilizar fosfato *in vitro*, uma importante característica de um micro-organismo promotor do crescimento vegetal. Neste trabalho buscamos avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio *in vitro* das cinco linhagens de bactérias endofíticas SS23 (*Staphylococcus hominis*), SS92 (*Enterococcus casseliflavus*), SS30 (*Staphylococcus* sp.), SS59 (*Enterococcus mundtii*) e SS121 (*Kocuria* sp.), isoladas de *Sapindus saponaria* L., bem como verificar a atividade promotora de crescimento vegetal em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em condições de casa de vegetação.

Materiais e métodos:

Bactérias endofíticas

Os endófitos foram resgatados da Coleção de Micro-organismos Endofíticos e do Ambiente (CMEA) do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá (LBIOMIC/UEM) – Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular.

Avaliação da Fixação Biológica de nitrogênio em meio semissólido

As cinco bactérias foram cultivadas em meio TSB (pH 7.3) durante 24h à 28°C. Para detectar a fixação do nitrogênio, utilizou-se meio Nfb semi-sólido, sem nitrogênio, de acordo com a metodologia descrita por Araújo et al. (2010).

Inoculação dos endófitos em sementes de feijão

Para o teste em casa de vegetação, os endófitos foram cultivados em erlenmeyers contendo 250 mL de meio TSB (pH 7.3) sob agitação (120 rpm) durante 1h à 28°C. A turbidez das bactérias endofíticas após o crescimento foi ajustada em salina 0,85% com auxílio da escala 0,5 de McFarland, para atingir aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. As sementes de feijão (*P. vulgaris* L.) foram desinfestadas superficialmente por imersão em etanol 70% durante 1 min, hipoclorito de sódio 3% durante 4 min e duas lavagens com água destilada. Alíquotas de 100 μ L da água da última lavagem foram semeadas em meios TSA e BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubadas a 28°C por 5 dias. Cinco sementes de feijão foram inoculadas nos erlenmeyers contendo a suspensão ajustada dos endófitos, e submetidos a agitação (60 rpm) a 25°C durante 24 horas. Como controle, transferiu-se as sementes para erlenmeyers contendo apenas meio TSB.

Avaliação em casa de vegetação

Após o processo de inoculação e incubação, as plântulas foram transferidas para copos de poliestireno (500 mL) contendo uma mistura de solo e substrato orgânico MECPLANT (1:1). O solo foi coletado na Universidade Estadual de Maringá – PR, e autoclavado à 121°C por 60 minutos. As plântulas foram inoculadas em cera de 1-2 cm de profundidade, empregando-se uma plântula por copo, com três repetições para cada tratamento. O experimento foi realizado na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Agronomia da UEM (23°24'12.18"S e 51°56'30.54"O).

Os parâmetros biométricos para cada tratamento como o número de folhas, altura, tamanho da raiz e biomassa seca foram avaliados 20 dias após a inoculação.

Análise estatística

Os dados coletados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância empregando o teste de Scott-knott ($p < 0,05$) com o auxílio do software SISVAR 5.6.

Resultados e discussão:

Seguindo a metodologia descrita por (ARAÚJO et al., 2010), todas as bactérias endofíticas utilizadas apresentaram a formação da película, sugerindo a capacidade de fixação biológica de nitrogênio em meio semissólido. Utilizando a mesma metodologia, Batista et al. (2018) também descrevem bactérias endofíticas capazes de fixar nitrogênio em meio semissólido.

A tabela 1 apresenta os dados obtidos na avaliação da promoção do crescimento das cinco bactérias endofíticas nas sementes de feijão. Não foram observados valores estatisticamente significativos para número de folhas, altura e comprimento das raízes. A linhagem SS92 (*E. casseliflavus*) destacou-se para peso seco (9,6 g) quando comparado com os demais endófitos.

Tabela 1 – Avaliação em casa de vegetação da inoculação das cinco bactérias endofíticas isoladas de *Sapindus saponaria* em sementes de feijão, 25 dias após a inoculação

Tratamentos	Número de folhas	Altura	Comprimento das Raízes	Peso seco
Controle	3,3a	21,6a cm	17,0a cm	7,3a g
SS23 (<i>S. hominis</i>)	2,6a	18,3a cm	21,6a cm	3,6b g
SS30 (<i>Staphylococcus</i> sp.)	3,3a	20,6a cm	25,0a cm	4,3b g
SS59 (<i>E. mundtii</i>)	3,0a	20,6a cm	22,6a cm	3,6b g
SS92 (<i>E. casseliflavus</i>)	4,0a	29,3a cm	23,0a cm	9,6a g
SS121 (<i>Kocuria</i> sp.)	3,0a	23,0a cm	15,0a cm	2,0b g

Batista et al. (2018), avaliaram a capacidade de promoção de crescimento em plantas de soja e milho por meio da inoculação de bactérias endofíticas. Os autores descrevem resultados significativos para a biomassa seca das plantas analisadas, em relação à seus controles sem inoculação. Os resultados apresentados por Kumar et al. (2012), também corroboram as habilidades de promotores de crescimento dos micro-organismos endofíticos, especialmente as bactérias.

Conclusões:

Dentre as principais características de micro-organismos promotores do crescimento vegetal estão a solubilização de fosfato e a Fixação biológica de nitrogênio. Todas as bactérias apresentaram capacidade de solubilizar fosfato (GARCIA, 2015) e fixar nitrogênio em meio semissólido. Em condições de casa de vegetação, apenas a linhagem SS92 (*E. casseliflavus*) apresentou resultado significativo em relação ao peso seco das plantas inoculadas, sugerindo seu potencial biotecnológico para o campo da agricultura.

Agradecimentos:

Fundação Araucária pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica. CAPES e CNPq pelo financiamento e apoio financeiro.

Referências:

BATISTA, B.D.; LACAVA, P.T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N.S.; BONATELLI, M.L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E.W.; PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; QUECINE, M.C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v.206, p. 33-42, 2018.

GARCIA, A. Bioprospecção de bactérias endofíticas cultiváveis de *Sapindus saponaria L.* e microbioma do solo associado à planta. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, p.61, 2015.

KUMAR, P.; DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K. Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, v.167, p. 493-499, 2012.

MCCONNELL M., S. MAMIDI, R. LEE, S. CHIKARA, M. ROSSI, R. PAPA, P. MCCLEAN, Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*), TAG. **Theoretical and applied genetics**, Theor. Angew. Genet. v. 121, p. 1103-1116, 2010.

PASSARI, A. K.; MISHRA, V. K.; LEO, V. V.; GUPTA, V. K. Phytohormone production endowed with antagonistic potential and plant growth promoting abilities of culturable endophytic bacteria isolated from *Clerodendrum colebrookianum* Walp. **Microbiological Research**, n. 1, v. 193, p.57-73, 2016.