

AVALIAÇÃO DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA MG60 ISOLADA DE *Mikania glomerata* NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) E SOJA (*Glycine max*)

Natieli Jenifer Mateus (PIC/UEM), Ana Paula Ferreira (UEM), João Arthur dos Santos de Oliveira (UEM), João Alencar Pamphile (Orientador), e-mail: japamphile@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR.

Ciências Biológica / Microbiologia.

Palavras-chave: Antagonismo, AIA, agente PGPB

Resumo:

Bactérias promotoras de crescimento (PGPB) podem colonizar diferentes órgãos das plantas, podendo produzir fitohormônios, mineralizar nutrientes e fixar nitrogênio. Neste trabalho, avaliamos a habilidade de antagonizar patógenos *in vitro* e características de PGPB em mudas de feijão em soja da bactéria endofítica MG60, isolada de *Mikania glomerata*. O antagonismo contra os fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* foi investigado por meio da técnica de cultura pareada e a produção de Ácido indolacético (AIA) foi quantificada em espectrofotômetro. Os melhores resultados para atividade antagonista foram obtidos contra *S. sclerotiorum* com 52,5% inibição. Quanto as habilidade de PGPB, a bactéria MG60 foi capaz de produzir cerca de 3,54 µg/mL de AIA e, no teste nas sementes de feijão e soja após 20 dias de tratamento, foram observados valores estatísticos significativos para o peso fresco da parte aérea (1,15 g), raiz (0,47 g) e altura (9.0 cm) das plantas tratadas com o endófito quando comparadas com o controle sem inoculação (peso fresco parte aérea – 0,97 g; raiz – 0,32 g; altura –7,15 cm) para plantas de soja, e para o tamanho das raízes das plantas tratadas (8,03 cm) em comparação com as plantas controle (7,14 cm) para plantas de feijão. No geral, a cepa endofítica MG60 apresentou resultados promissores para atividade antagonística *in vitro*, especialmente contra *S. sclerotiorum*, e também sugere seu potencial como agente PGPB de plantas de feijão e soja, culturas de grande interesse agrônomo.

Introdução

Micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de plantas de maneira assintomática e, que podem auxiliar seu hospedeiro com a produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica, atuando como agentes promotores do crescimento vegetal (PGPB) ou até mesmo induzir resistência sistêmica contra patógenos (TAGHAVI et al., 2009).

A bactéria endofítica MG60, pertencente a Coleção de Microrganismos Endofíticos (CMEA) e do Ambiente do Laboratório de Biotecnologia Microbiana-UEM (LBIOMIC), foi isolada da planta medicinal *Mikania glomerata*, conhecida popularmente como Guaco. Este endófito apresentou em trabalhos anteriores (BULLA, 2017) atividade antagonista contra patógenos, fixação biológica *in vitro* de nitrogênio, bem como a presença do gene *nifH* detectado via PCR. Diante desta perspectiva, torna-se relevante o estudo da contribuição da linhagem endofítica MG60 na promoção do crescimento de plantas de interesse agrônomo como feijão e soja, uma vez que este endófito possui características que a classificam como PGPB. Neste sentido, neste trabalho avaliamos a capacidade de PGPB da bactéria endofítica MG60 em sementes de feijão e soja, bem como a capacidade de antagonizar *in vitro* patógenos de importância agrônoma como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum* sp.

Materiais e métodos

Atividade contra fitopatógenos

Foram utilizados os fungos fitopatogênicos *S. sclerotiorum* e *Colletotrichum* sp. CNPUV38 pertencentes à CMEA do LBIOMIC (UEM, PR-BR). A avaliação antagonista *in vitro* da linhagem MG60, bem como o cálculo do índice de inibição aferindo-se a área de crescimento micelial do fitopatógeno com o auxílio do software ImageJ v 1.46r, foi realizada em quintuplicata de acordo com a metodologia descrita por Specian et al. (2016).

Produção de ácido 3-indolacético (AIA)

O isolado foi crescido em meio TSB 10%, acrescido de 5 mM de L-triptofano, por três dias a 28 °C, no escuro. Após, a cultura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min. Em alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionados 2 mL do Reagente de Salkowski, reagindo por 30 min no escuro, em temperatura ambiente. Para a análise quantitativa, foram realizadas leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda de 520 nm, normalizando as leituras por meio da curva padrão $R^2=0,98$, obtida com diferentes concentrações do padrão comercial do ácido 3-indolacético.

Inoculação do endófito nas sementes

Uma suspensão de 10^8 UFC.mL⁻¹ de acordo com a escala de McFarland 0,5, da bactéria endofítica MG60 foi inoculada (durante 30 min, sem agitação) em sementes de soja e feijão desinfestadas superficialmente de acordo com a metodologia proposta por Oliveira et al. (2020). Posteriormente, as sementes foram transferidas para frascos contendo 90g de solo autoclavado e incubadas por 20 dias à 28°C. Como controles foram realizados a imersão das sementes somente em salina 0,85% esterilizada. Todo o experimento foi realizado com 10 repetições, e após a incubação foram analisados os parâmetros biométricos de acordo com Oliveira et al.

(2020). Todos os dados foram submetidos a análise de variância empregando o teste de Scott-Knott com $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os resultados antagonísticos mais significativos foram contra *S. sclerotiorum*, sendo o tratamento contra a bactéria MG60 destacou-se estatisticamente agrupando-se com o controle com fungicida comercial (Tabela 1). O índice de inibição para *Colletotrichum* sp. foi de 18,14% (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação *in vitro* da atividade antagonística da bactéria endofítica MG60 contra os patógenos *Colletotrichum* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*.

<i>Colletotrichum</i> sp.		
Tratamento	Média do crescimento micelial	Índice de inibição (%)*
Controle 1	53,1c cm ²	---
Controle 2	40,6a cm ²	23,5
MG60	43,4b cm ²	18,1
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		
Tratamento	Média do crescimento micelial	Índice de inibição (%)*
Controle 1	54,3b cm ²	---
Controle 2	25,5a cm ²	53
MG60	25,8a cm ²	52,5

Controle 1= controle apenas com o fitopatógeno. Controle 2= fitopatógeno contra fungicida comercial. *Valores representados com a mesma letra minúscula não difere estatisticamente de acordo com o teste de Scott-knott com 5% de significância.

Para a quantificação de AIA, a bactéria endofítica MG60 produziu aproximadamente 3,54 µg/mL do hormônio. Quanto ao teste nas sementes, para as plantas de soja, foram observados valores estatísticos significativos para o peso fresco da parte aérea (1,15 g), raiz (0,47 g) e altura (9.0 cm) das plantas inoculadas com o endófito quando comparadas com o controle sem inoculação (peso fresco parte aérea – 0,97 g; raiz – 0,32 g; altura – 7,15 cm) (Tabela 2).

Tabela 2- Avaliação da bactéria endofítica MG60 inoculadas em sementes de *Glycine max* (Soja).

Tratamento	NF	Altura	TR	PFFA	PFR
Controle*	8,2 ^a	7,5b cm	14,6a cm	0,97b g	0,32b g
MG60	8,3 ^a	9,0a cm	14,9a cm	1,15a g	0,47a g

NF= Número de folhas; TR= tamanho da raiz; PFFA= peso fresco parte aérea; PFR= peso fresco raiz. *Plantas sem inoculação de células bacterianas; Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-knott com 5% de significância.

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros biométricos das mudas de feijão inoculadas e não inoculadas (controle) com o endófito MG60. Foram encontrados valores estatísticos significativos, de acordo com o teste de Scott-knott, para o tamanho das raízes das plantas

tratadas (8,03 cm) em comparação com as plantas controle não tratadas (7,14 cm) (Tabela 3).

Tabela 3- Avaliação da bactéria endofítica MG60 inoculadas em sementes de *Phaseolus vulgaris* (Feijão comum).

Tratamento	NF	Altura	TR	PFPA	PFR
Controle*	3,8 ^a	5,1b cm	7,14b cm	2,28a g	1,40a g
MG60	4,4 ^a	6,1a cm	8,03a cm	2,42a g	1,25a g

NF= Número de folhas; TR= tamanho da raiz; PFPA= peso fresco parte aérea; PFR= peso fresco raiz. *Plantas sem inoculação de células bacterianas; Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-knott com 5% de significância.

Conclusões

Neste trabalho, a cepa endofítica MG60 apresentou resultados promissores para atividade antagonística *in vitro*, especialmente contra *S. sclerotiorum*, e também sugere seu potencial como agente promotor do crescimento vegetal de plantas de feijão e soja, culturas de grande interesse agrônômico.

Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- BULLA, A.M. 2017. 66f. **Seleção de bactérias endofíticas associadas à *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) com potencial biotecnológico aplicado à agricultura.** Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá). Maringá, 2017.
- OLIVEIRA, J. A.; POLLI, A.D.; POLONIO, J. C.; ORLANDELLI, R.C.; CONTE, H.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospection and molecular phylogeny of culturable endophytic fungi associated with yellow passion fruit. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 42, e48321, 2020.
- SPECIAN, V.; COSTA, A.T.; FELBER, A.C.; POLONIO, J.C. AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Molecular phylogeny and biotechnological potential of bacterial endophytes associated with *Malpighia emarginata*. **Genetics and Molecular Research**, v.15, p.1-19, 2016.
- TAGHAVI, S.; GARAFOLA, C.; MONCHY, S.; NEWMAN, L.; HOFFMAN, A.; VAN DER LELIE, D. Genomic survey and characterization of endophytic plant bacteria that exhibit a beneficial effect on the growth and development of poplars. **Applied and environmental microbiology**, v.75, n.3, p.748-757, 2009.