



Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas,
Agrárias e da Saúde

ISSN: 1415-6938

editora@kroton.com.br

Kroton Educacional S.A.
Brasil

Douglas de Souza, Ricardo; Ricci Biz, Andressa; Aparecida Furtado de Mendonça,
Elisabeth; Soares, Marcos Antônio

Potencial Agronômico de Bactérias Endofíticas de *Echinodorus scaber* Rataj (
macrophyllus) em Plântulas de Soja

Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, vol. 21, núm. 3, 2017, pp.
187-193

Kroton Educacional S.A.
Campo Grande, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26054727010>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Potencial Agronômico de Bactérias Endofíticas de *Echinodorus scaber* Rataj (*macrophyllus*) em Plântulas de Soja

Agronomic Potential of Endophytic Bacteria in *Echinodorus scaber* Rataj (*macrophyllus*) in Soybean Seedlings

Ricardo Douglas de Souza^{ab}; Andressa Ricci Biz^{bc};
Elisabeth Aparecida Furtado de Mendonça^b; Marcos Antônio Soares^{d*}

^aInstituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus São Vicente. MT, Brasil.

^bUniversidade Federal de Mato Grosso, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agricultura Tropical. MT, Brasil.

^cUniversidade de Cuiabá, Campus Beira Rio. MT, Brasil.

^dUniversidade Federal de Mato Grosso, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ecologia e Conservação da Biodiversidade. MT, Brasil.

*E-mail: drmasoares@gmail.com

Resumo

A soja é umas das culturas mais produzidas no mundo, tendo safra na casa dos milhões de toneladas/ano. O aumento na produção dessa cultura permeia o desenvolvimento de tecnologias, que permitam conservar a produtividade e minimizar os dados ambientais oriundos de seu manejo. Uma opção é a inoculação de micro-organismos endofíticos que contribuem com o desenvolvimento dessa cultura. Objetivando averiguar o potencial de produção do fitormônio ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato de cálcio por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* e avaliar sua aplicação na promoção de crescimento de plântulas de soja, foram acessadas 61 bactérias endofíticas de *E. scaber* para os testes. A produção de AIA foi quantificada por método colorimétrico e a solubilização de fosfato de cálcio procedeu-se com inoculação das linhagens endofíticas, em meio de cultura específico e, posteriormente, o índice de solubilização foi calculado. Para o teste de promoção de crescimento, sementes de soja foram microbiolizadas com linhagens de bactérias produtoras de AIA e solubilizadoras de fosfato de cálcio. Foram avaliadas a porcentagem de germinação, índice de velocidade de emergência e a massa seca das plântulas de soja. As linhagens de interesse foram identificadas pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os resultados evidenciaram, que todas as bactérias endofíticas de *E. scaber* avaliadas são capazes de produzir AIA e, grande parte delas pode solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* e que algumas linhagens desses micro-organismos possuem traços de promoção de crescimento de plântulas de soja, evidenciado pelo aumento de massa seca.

Palavras-chave: Ácido Indolacético. Solubilização de Fosfato. Promoção de Crescimento. Sementes de Soja.

Abstract

Soybean is one of the most produced crops in the world, having a harvest of millions of tons/year. The increase in the production of this culture permeates the development of technologies that allow to conserve the productivity and to minimize the environmental data arising from its handling. One option is the inoculation of endophytic microorganisms that contribute to the development of this culture. In order to investigate the production potential of indole acetic acid phytohormonium (AIA) and calcium phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from *Echinodorus scaber* and to evaluate its application in the promotion of soybean seedlings growth, 61 endophytic *E. scaber* bacteria were tested. The AIA production was quantified by colorimetric method and the calcium phosphate solubilization was carried out with inoculation of the endophytic lines in specific culture medium and afterwards the solubilization index was calculated. For the growth promotion test, soybean seeds were microbiolized with strains of AIA producing bacteria and calcium phosphate solubilizers. The germination percentage, the emergence speed index and the dry mass of the soybean seedlings were evaluated. The lines of interest were identified by the partial sequencing of the 16S rRNA gene. The results showed that all the endophytic bacteria of *E. scaber* evaluated are capable of producing AIA and most of them can solubilize calcium phosphate *in vitro* and that some strains of these microorganisms have growth promoting traits of soybean seedlings evidenced by the increase of dry mass.

Keywords: Indoleacetic Acid. Phosphate Solubilization. Growth Promotion. Soybean Seed.

1 Introdução

A soja (*Glycine max* L.) é a principal oleaginosa cultivada no mundo, alcançando a produção de 351.775 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (USDA, 2017). Segundo Hiroshi e Lazzarotto (2011), o Brasil ocupa o segundo lugar em produção, perdendo apenas para os Estados Unidos. O crescente aumento na produção se deve, entre outros, a sua qualidade nutricional, com elevado teor proteico, empregado na alimentação humana e animal, seu potencial para a produção de óleos aplicados na alimentação humana e na síntese do biodiesel. Além disso, é cultura padronizada e uniforme, com aptidão de ser comercializada e produzida em diversos países

do mundo (HIROSHI; LAZZAROTTO, 2011).

Nas últimas décadas, tem-se dado ênfase para pesquisas que atinem alternativas biológicas para aumentar a produtividade agrícola (BALDOTTO *et al.*, 2010; LANNA FILHO *et al.*, 2010). Essas pesquisas têm encontrado novas formas de disponibilizar nutrientes, promover o crescimento e auxiliar na resistência a estresses bióticos e abióticos, em culturas cultiváveis, visando assim, aumentar a produção e manter a sustentabilidade (AKELLO; DUBOIS; GOLD, 2007; BAE *et al.*, 2009; BARRETTI; SOUZA; POZZA, 2008; RYAN *et al.*, 2008; SENTHILKUMAR *et al.*, 2009; BALDOTTO *et al.*, 2010; LANNA FILHO *et al.*, 2010). Uma das opções para se

conseguir alcançar o desafio de aumentar a produção e reduzir impactos ambientais é o uso de micro-organismos endofíticos, com potencial de aplicação agronômico (TEOTIA *et al.*, 2017).

Micro-organismos endofíticos, segundo Schuls e Boyle (2005), colonizam internamente o tecido vegetal, intra ou extracelular, detectados em um momento particular, de forma mutualística, em hospedeiros aparentemente saudáveis.

Os estudos dessa intrigante interação micro-organismo endofítico-planta demonstram que muitos desses micro-organismos podem favorecer o desenvolvimento de seu hospedeiro de formas diretas, pela produção de fitormônios, como ácido indolacético - AIA (KHAN *et al.*, 2012; PICCOLI *et al.*, 2011), ou aumentando e melhorando a nutrição mineral do hospedeiro, como a solubilização do fósforo imobilizado no solo (MA *et al.*, 2011). Outra forma de favorecimento é a indireta, produzindo compostos secundários, que auxiliam na defesa contra a herbivoria e no aumento da resistência a outros organismos patogênicos (YANG *et al.*, 2011).

Diversos estudos relatam o potencial de bactérias endofíticas para promover crescimento, tanto de parte aérea quanto de raiz, aumentar a produção de frutos e melhorar o desempenho da planta diante de estresses abióticos, em diversas culturas (KHAN *et al.*, 2012).

Uma gama de bactérias endofíticas apresenta hábito generalista em relação ao seu hospedeiro. Pode-se observar essa característica nas linhagens endofíticas isoladas por Khan *et al.* (2012), que foram obtidas de espécies nativas diferentes das culturas aplicadas, demonstrando capacidade de colonizar outras espécies, além de seu hospedeiro original. No entanto, os autores indicam que são necessários estudos prévios entre cultivar-micro-organismo endofítico por se tratar de uma relação estritamente específica.

Diante dessa perspectiva, esse trabalho tem por objetivo averiguar o potencial de produção do fitormônio AIA, solubilização de fosfato por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj (*macrophyllus*) e avaliar sua aplicação para promoção de crescimento de plântulas de soja.

2 Material e Métodos

2.1 Micro-organismos e meios de cultura

Um total de 61 bactérias endofíticas, isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj (*macrophyllus*), do Pantanal mato-grossense, foram acessadas no banco de micro-organismos pertencentes ao laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana - LABEM da Universidade Federal de Mato Grosso/Cuiabá. As bactérias acessadas foram submetidas a um *screening* para avaliar o potencial de produção de AIA, solubilização de fosfato de cálcio e promoção de crescimento de plântulas de soja.

Ágar nutriente (AN) foi o meio usado para manutenção das culturas de bactérias. Quando necessário, as bactérias foram ativadas em Caldo Nutriente (CN) por 24h, sob agitação de

125 rpm, a temperatura de 28 °C aproximadamente.

2.2 Produção do fitormônio Ácido indolacético pelas linhagens endofíticas

A produção de AIA foi avaliada por método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). Inicialmente, as bactérias foram crescidas em 10 mL de meio de cultura CN. A densidade óptica (DO) de todas as amostras foi ajustada para A_{600} 0,5 através de diluição com solução salina (0,85%). Posteriormente, transferiram-se os isolados (5% v/v) para o meio caldo nutriente suplementado com triptofano (100 µg mL⁻¹) e estes foram incubados por 72h, no escuro, a 28 °C sob agitação constante (125 rpm) (MELO PEREIRA *et al.*, 2012) characterized by the simultaneous use of culture-dependent and culture-independent methods, to investigate endophytic bacterial communities in strawberry (*Fragaria ananassa*).

Após o período de incubação, os isolados foram centrifugados a 12.000G por 5 min. Em seguida, procedeu-se a avaliação da produção de AIA, através de um mix contendo 1 mL do sobrenadante e 1 mL do reagente de Salkowski (1 mL de FeCl₃ – 1,35g/10 mL; 50 mL de HClO₄ – 35%). Os tubos contendo o mix foram mantidos no escuro por 15 min a 28 °C. Como controle negativo, foi utilizado apenas o caldo nutriente suplementado com triptofano. A presença de AIA foi visualizada pela coloração rósea, enquanto que na sua ausência a coloração observada foi amarela.

A quantificação de AIA foi realizada pela leitura da absorvância em espectrofotômetro (530 nm). A concentração de AIA foi determinada se utilizando de uma curva padrão de AIA sintético (Sigma). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e submetido à Análise da Variância (ANOVA). O teste de médias adotado foi Skott-Knott, em nível de 5% de significância.

2.3 Screening dos isolados endofíticos para solubilização de fosfato de cálcio

Os isolados com resultado positivo para produção de AIA foram submetidos à avaliação de solubilização de fosfato de cálcio, segundo Nautiyal (1999). Alíquotas de 5 µL das soluções bacterianas, com DO ajustada para A_{600} 0,5, foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura sólido National Botanical Research Institute's phosphate - NBRIP e incubadas a 28 °C por 15 dias.

Os isolados que apresentaram formação de halos translúcidos, no meio de cultura, foram considerados positivos para solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*, e submetidos novamente ao teste em triplicata. A avaliação do índice de solubilização de fosfato foi realizada no décimo quinto dia por meio da fórmula:

$$IS \text{ (mm)} = \frac{DTH}{DC}$$

Em que IS é o índice de solubilização; DTH é o diâmetro

total do halo e DC é o diâmetro da colônia de bactéria. O IS foi classificado de acordo com Hara e Oliveira (2005), em baixa solubilização (IS < 2), média solubilização (2 < IS < 3) e alta solubilização (IS > 3).

2.4 Microbiolização de sementes de soja com bactérias endofíticas isoladas de *E. scaber*

Sementes de soja pertencente a cultivar TMG 132RR, oriundas da Fazenda Bela Vista, Município de Sinop-MT, foram usadas nesse ensaio. Sete linhagens de bactérias endofíticas, três com maior potencial de solubilizar fosfato de cálcio, três com maiores concentrações de AIA e uma intermediária para solubilizar fosfato de cálcio e produzir AIA foram usadas nesse ensaio.

As bactérias foram ativadas em CN por 24h e a suspensão de células de cada linhagem bacteriana foi ajustada no espectrofotômetro para $A_{540}=0,5$ utilizando solução salina (0,85%).

A microbiolização seguiu as recomendações de Luz (2001), com modificações. As sementes de soja foram submersas em suspensões das bactérias endofíticas durante 10 min a 25 °C, sob agitação manual. As sementes do tratamento controle foram submersas em CN esterilizado sob as mesmas condições dos demais tratamentos.

Foram utilizadas quatro repetições com 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Após a inoculação, as sementes foram semeadas em bandejas contendo areia lavada e acondicionadas em ambiente de laboratório sob fotoperíodo de 12h a temperatura de 25 °C e umidade relativa do ar de aproximadamente 51%.

Foram determinadas: a porcentagem de germinação de plântulas, o índice de velocidade de emergência (EDMOND; DRAPALA, 1958) e a massa seca da plântula no décimo terceiro dia.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott, a 5% de significância.

2.5 Análise molecular das bactérias endofíticas selecionadas

A extração do DNA genômico total das bactérias viáveis selecionadas, no experimento *in vivo*, foi realizada segundo a metodologia de Cheng *et al.* (2006)

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada utilizando os *oligonucleotídeos* 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTCAG-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (WEISBURG, 1991).

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger com o Kit Big Dye no ABI3100 *Applied Biosystem*, e as sequências comparadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com sequências conhecidas, por uma pesquisa Blastn (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Os resultados mais próximos foram incluídos e alinhados utilizando ClustalW.

3 Resultados e Discussão

3.1 Bactérias endofíticas de *Echinodorus scaber* Rataj (*macrophyllus*) com potencial para produzir AIA e solubilizar fosfato de cálcio

Todas as 61 bactérias estudadas, nessa pesquisa, foram positivas para a produção de AIA, destas, 47 (78%) foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* (Quadro 1).

Quadro 1 - Avaliação da produção de AIA e solubilização de fosfato de cálcio por bactérias endofíticas isoladas de *E. scaber*.

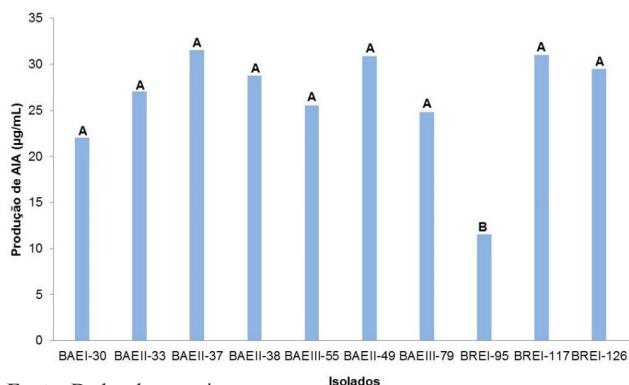
Isolado	AIA	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Isolado	AIA	Ca ₃ (PO ₄) ₂
BAEI-1	+	+	BAEII-50	+	+
BAEI-2	+	+	BAEIII-51	+	-
BAEI-3	+	+	BAEIII-54	+	+
BAEI-4	+	-	BAEIII-55	+	+
BAEI-5	+	+	BAEIII-57	+	+
BAEI-7	+	+	BAEIII-58	+	+
BAEI-9	+	+	BAEIII-72	+	-
BAEI-10	+	+	BAEIII-75	+	+
BAEI-11	+	+	BAEIII-78	+	-
BAEI-12	+	+	BAEIII-79	+	+
BAEI-13	+	+	BREI-84	+	-
BAEI-15	+	+	BREI-85	+	-
BAEI-16	+	+	BREI-88	+	-
BAEI-17	+	+	BREI-90	+	+
BAEI-18	+	+	BREI-95	+	+
BAEI-21	+	+	BREI-96	+	+
BAEI-23	+	+	BREI-97	+	+
BAEI-24	+	+	BREIII-105	+	+
BAEI-25	+	+	BREIII-108	+	-
BAEI-26	+	+	BREI-115	+	+
BAEI-28	+	+	BREI-116	+	-
BAEI-30	+	+	BREI-117	+	-
BAEII-33	+	+	BREI-118	+	-
BAEII-35	+	+	BREI-121	+	+
BAEII-37	+	+	BREI-124	+	-
BAEII-38	+	+	BREI-125	+	-
BAEII-40	+	+	BREI-126	+	+
BAEII-41	+	+	BREI-129	+	-
BAEII-44	+	+	BREI-132	+	+
BAEII-48	+	-	BREI-134	+	+
BAEII-49	+	+	-	-	-

+ produz AIA e/ou solubiliza fosfato. - não solubiliza fosfato.

Fonte: Dados da pesquisa.

Dentre os 61 isolados e produtores de AIA foram selecionados aleatoriamente dez para avaliação da concentração da produção deste fitormônio. Nove das dez bactérias avaliadas não diferiram estatisticamente, na concentração de AIA, produzindo entre 22 e 31,5 µg/mL. Apenas a bactéria BREI-95 produziu 11,5 µg/mL (Figura 1).

Figura 1 - Produção de AIA por bactérias endofíticas de *E. scaber*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Fonte: Dados da pesquisa.

Assumpção *et al.* (2009) também observaram uma ampla gama de bactérias produtoras de AIA em sementes de soja, em que 100% dos isolados bacterianos obtidos produziram esse fitormônio. Resultados semelhantes foram encontrados por Melo Pereira *et al.* (2011), quando isolaram bactérias endofíticas de morango e constataram que, aproximadamente, 80% das linhagens sintetizaram AIA. Segundo os mesmos autores, essas linhagens possuem grande potencial para promover o crescimento de morangueiros. Isso porque o AIA é a forma predominante das Auxinas, que é um dos grupos de fitormônio conhecido por estimular o crescimento de vegetais

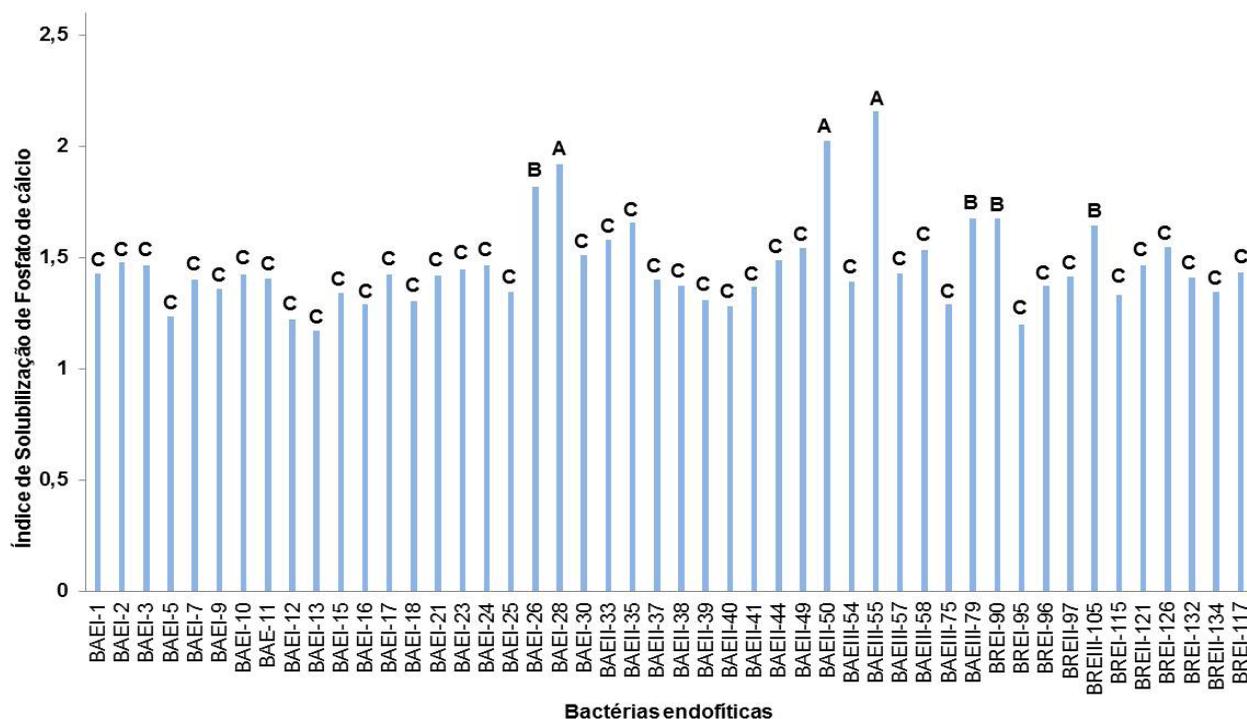
através do alongamento celular (KOTAKE *et al.*, 2000).

A concentração de AIA encontrada na maioria dos isolados está de acordo com o trabalho de Assumpção *et al.* (2009), que obtiveram entre 2,6 e 34,9 µg/mL ao avaliar a concentração desse fitormônio por bactérias endofíticas isoladas de soja. Valores próximos também foram descritos por Patel *et al.* (2011), quando analisaram a produção de AIA por *Pseudomonas*.

Estudos anteriores demonstraram que a concentração de AIA, em inoculantes comerciais, variou de 6,62 e 13,16 µg/mL para *Bradyrhizobium japonicum* E109 e *Azospirillum brasilense* Az39, respectivamente (CASSAN *et al.*, 2009). Esses relatos indicam a maior eficiência das linhagens endofíticas presentes nesse trabalho para produzir AIA. Porém, dados de pesquisas recentes apresentam um número reduzido de *Bradyrhizobium* com capacidade de produção de AIA (PRÉVOST; JUGE, 2012), indicando que pesquisas que visam analisar o sinergismo entre linhagens padrão e endofíticas, produtoras de fitormônio, podem ser uma boa alternativa para promover o crescimento de planta como sugerem Lima *et al.* (2011) na cultura de feijão.

Entre os 48 isolados positivos para solubilizar fosfato, 46 possuem IS baixo, e os outros dois isolados apresentaram IS médio. As bactérias com maiores índices de solubilização foram os isolados BAEIII-55, BAEII-50 e BAEI-28 com IS de 2,15; 2,02 e 1,91, respectivamente (Figura 2).

Figura 2 - Índice de solubilização de fosfato por Bactérias endofíticas isoladas de *E. scaber* em meio NBRIP após 15 dias de incubação. As barras nas colunas representam o desvio padrão das médias.



Fonte: Dados da pesquisa.

Bactérias endofíticas com habilidade de solubilizar fosfato *in vitro* são obtidas de diversos hospedeiros (LUO *et al.*, 2011;

NYAMBURA NGAMAU, 2012; QUECINE *et al.*, 2012) reisolation, and quantitative PCR (qPCR). O fósforo é um

dos principais nutrientes necessários para o desenvolvimento das plantas, porém cerca de 90 a 95% do fósforo do solo se encontra presente, em forma insolúvel, inviabilizando o aproveitamento desse nutriente pelas plantas (VASSILEVA; VASSILEV; AZCON, 1998).

Essa aptidão de solubilizar fósforo por bactérias endofíticas pode ocorrer pela produção de vários ácidos orgânicos, como: ácido málico, acético, cítrico, fumárico, láctico, succínico e glucônico (LEYVAL, 1989; TAHA *et al.*, 1969). Segundo He *et al.* (1996), ácidos reduzem o pH do solo, aumentando a solubilização de fósforo, tendo assim, papel importante para esse processo. Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que as bactérias endofíticas isoladas de *E. scaber* possuem potencial de solubilizar formas de fósforo insolúveis.

3.2 Sequenciamento do gene 16S rDNA

A sequência parcial do gene 16S do rDNA demonstrou que, dentre os isolados identificados, apenas BREI-117 pertence a gênero diferente, sendo BAEI-26, BAEII-49, BAEIII-79 pertencentes ao gênero *Enterobacter* e BREI-117 pertencentes ao gênero *Klebsiella*, quando comparadas a sequências depositadas no GenBank (Quadro 2). Os isolados BAEI-28 e BAEIII-55 perderam viabilidade antes da realização das análises moleculares, impedindo o processo de sequenciamento e identificação das mesmas.

Quadro 2 - Identificação de bactérias endofíticas isoladas de *E. scaber* com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Isolados	GenBank	Nº de Acesso	% de Identidade
BAEI-26	<i>Enterobacter sp.</i>	JQ396391.1	99
BAEI-28	_*	-	-
BAEII-37	<i>Enterobacter sp.</i>	JQ396391.1	99
BAEII-49	<i>Enterobacter sp.</i>	JQ396391.1	99
BAEIII-55	-	-	-
BAEIII-79	<i>Enterobacter sp.</i>	JQ396391.1	99
BREI-117	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JF772061.1	99

* isolados não identificados.

Fonte: Dados da pesquisa.

Na literatura, esses dois gêneros são comumente descritos como produtores de fitormônio e solubilizadores de fósforo (SANTI FERRARA *et al.*, 2011), desempenhando papel importante no crescimento de milho e de arroz (JHA *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2012).

3.3 Promoção de crescimento de plântulas de soja

As bactérias selecionadas para a microbilização de sementes de soja foram obtidas a partir dos experimentos prévios para produção de AIA e solubilização de fósforo. Foram selecionadas as três bactérias viáveis durante a montagem do experimento, com maior índice de solubilização de fósforo (BAEI-26, BAEI-28, BAEIII-55), as três com maiores concentrações de AIA (BAEII-37, BAEII-49, BREI-

117) e uma intermediária para solubilizar fósforo e produzir AIA (BAEIII-79).

Nenhuma das linhagens de bactérias endofíticas isoladas de *E. scaber* inoculadas em soja acarretou prejuízo para a germinação ou a velocidade de emergência das plântulas (Quadro 3).

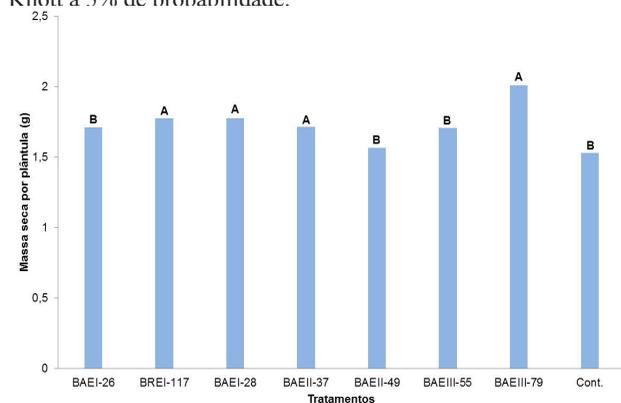
Quadro 3 - Dados médios de germinação e índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas normais de soja aos 13 dias após a instalação.

Tratamentos	Germinação (1ª contagem)	Germinação	IVE (%)
	%		
Testemunha	74 a*	97 a	4.58 a
BAEI-26	73 a	97 a	4.60 a
BAEI-28	66 a	97 a	4.54 a
BAEII-37	60 a	98 a	4.59 a
BAEII-49	50 b	97 a	4.47 a
BAEIII-55	63 a	97 a	4.36 a
BAEIII-79	44 b	97 a	4.51 a
BREI-117	66 a	99 a	4.39 a
CV%	9,12	2,93	3.16

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Quatro das sete bactérias endofíticas testadas aumentaram a massa seca das plântulas de soja (Figura 4).

Figura 4 - Incremento de massa seca de plântulas de soja inoculadas com bactérias endofíticas isoladas de *E. scaber* após 13 dias de semeadura. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Fonte: Dados da pesquisa.

Esse resultado está de acordo com os relatos de Jha Kumar (2007) e Kumar *et al.* (2012), que identificaram linhagens de bactérias endofíticas do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter* como agentes promotores de crescimento de planta de arroz e de milho. Além disso, *Enterobacter* e *Klebsiella* já foram descritas como pertencentes à comunidade endofítica de soja (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009; KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004) "given": "Paulo Teixeira", {"family": "Dias", "given": "Armando Cavalcante Franco"}, {"family": "Azevedo", "given": "Jo\u00e3o L\u00facio de"}, {"family": "Menten", "given": "Jos\u00e9 Ot\u00e1vio Machado"}], "container-title": "Pesquisa Agropecu\u00e1ria"

u00e1ria Brasileira”, “id” : “ITEM-1”, “issue” : “5”, “issued” : { “date-parts” : [[“2009”, “5”]] }, “page” : “503-510”, “title” : “Diversidade e potencial biotecnol\u00f3gico da comunidade bacteriana endof\u00edtica de sementes de soja”, “type” : “article-journal”, “volume” : “44” }, “uris” : [“http://www.mendeley.com/documents/?uid=5aebae25-f0a5-484b-abc9-9d474a06943b”] }, { “id” : “ITEM-2”, “itemData” : { “DOI” : “10.1111/j.1462-2920.2004.00658.x”, “abstract” : “Endophytic and epiphytic bacteria were isolated from two soybean cultivars (Foscarin and Cristalina. Assumpção *et al.* (2009) obtiveram resultado positivo para o incremento da massa seca da raiz de plantas de soja ao inocular uma linhagem de *Enterobacter*; isolada de semente de soja.

O resultado positivo de promoção de crescimento de plântula de soja pelos isolados BREI-117 (*Klebsiella sp.*), BAEII-37 e BAEIII-79 (*Enterobacter sp.*) encontrado em nosso trabalho pode estar associado diretamente a produção de AIA e solubilização de fosfato, indicados como responsáveis pela acumulação de massa seca (QUECINE *et al.*, 2012). Porém, o isolado BAEI-26 que também pertence ao gênero *Enterobacter*; não apresentou resultado satisfatório na promoção de crescimento de plântulas de soja. Esse resultado também foi demonstrado por Assumpção *et al.* (2009), ao inocular duas linhagens de *Enterobacter* em soja; indicando que, além da produção de fitormônio e solubilização de fosfato, existem outros fatores importantes para o bom êxito da promoção de crescimento, sendo a especificidade da interação bactéria-planta fundamental nesse caso. Além disso, as variações dos genótipos das espécies envolvidas também possuem papel importante (KHAN *et al.*, 2012; SALVAUDON *et al.*, 2008).

A aplicação de bactérias endofíticas, em espécies não-hospedeiras, de interesse agronômico já vem sendo relatada com bom êxito para várias culturas como o arroz, cana-de-açúcar, laranja, feijão, abobora, pimentão (LACAVA; ARAUJO; AZEVEDO, 2007) the endophytic bacterial community associated with citrus has been studied as an important component interacting with *Xylella fastidiosa*, the causal agent of citrus variegated chlorosis (CVC; KHAN *et al.*, 2012; QUECINE *et al.*, 2012; ZAKRIA *et al.*, 2008). Indicando ser uma alternativa para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, diminuindo assim o uso de defensivos e fertilizantes químicos.

Khan *et al.* (2012) utilizaram linhagens de bactérias endofíticas isoladas de *Populus trichocarpa* e *Sitka sitchensis* e obtiveram resultados promissores na promoção de crescimento de várias culturas de interesse agronômico, advertindo acerca da necessidade de estudos peculiares entre bactéria endofítica-cultura, por se tratar de uma associação específica entre cada linhagem-cultivar. Outro aspecto relevante sobre o uso de bactérias endofíticas em plantas não-hospedeiras é a possibilidade de aplicação de diversos isolados com potencial de produção de fitormônio, e disponibilização de nutrientes, presentes em espécies não cultivadas, sobre

culturas de interesse agronômico como a soja.

Esse é o primeiro relato de bactérias endofíticas de *E. scaber*, com traços funcionais de promoção de crescimento de plantas com efeito positivo em plântulas de soja, isoladas no Pantanal de Mato Grosso, Brasil. Esse estudo abre uma vasta gama de possibilidades para pesquisas com micro-organismos endofíticos do Pantanal brasileiro a serem empregados na agricultura.

4 Conclusão

Das 61 bactérias endofíticas avaliadas nesse estudo, todas sintetizaram AIA e 47 isolados solubilizaram fosfato de cálcio *in vitro*.

Sementes de soja microbiolizadas com os isolados endofíticos não foram prejudicadas em seu estágio de germinação, permanecendo inalterado o seu vigor.

Os isolados BAEI-28, BAEII-37, BAEIII-79 pertencente ao gênero *Enterobacter* e BREI-117 pertencente ao gênero *Klebsiella* promoveram o aumento de massa seca de plântulas de soja.

Referências

- AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.S. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa spp.*). *J. Invertebr. Pathol.*, v.96, p.34-42, 2007.
- ALTSCHUL S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v.215, p.403-410, 1990.
- ASSUMPCÃO, L.D.C. *et al.* Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesq. Agropecu. Bras.*, v.44, n.5, p.503-510, 2009.
- BAE, H. *et al.* The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.*, v.60, n.11, p.3279-3295, 2009.
- BALDOTTO, L.E.B. *et al.* Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, v.34, p.349-360, 2010.
- BARRETTI, P.B.; SOUZA, R.M.; POZZA, E.A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. *Ciênc. Agrotec.*, v.32, p.731-739, 2008.
- CASSAN, F. *et al.* *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.*, v.45, n.1, p.28-35, 2009.
- CHENG, H.R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol. Lett.*, v.28, n.1, p.55-9, 2006.
- COSTA, F. E. C.; MELO, I. S. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Afr. J. Microb. Res.*, v.6, n.6, p.1345-1353, 2012.
- EDMOND, J.B.; DRAPALA, W.J. The effects of temperature, sand, soil, and acetone on germination of okra seeds. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, v.71, p.428-434, 1958.

- GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiol.*, v.26, p.192-195, 1951.
- HARA, F.A.D.S.; OLIVEIRA, L.A.D. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.40, n.7, p.667-672, 2005.
- HE, Z.L. *et al.* Factors affecting phosphate rock dissolution in acid soil amended with liming materials and cellulose. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.60, p.1596-1601, 1996.
- HIROSHI, H.M.; LAZZAROTTO, J.J. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. *Embrapa Soja*, n.319, 2011.
- JHA, P.N.; KUMAR, A. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. *J. Appl. Microbiol.*, v.103, n.4, p.1311-1320, 2007.
- KHAN, Z. *et al.* Bacterial and Yeast Endophytes from Poplar and Willow Promote Growth in Crop Plants and Grasses. *ISRN*, v.2012, p.1-10, 2012.
- KOTAKE, T. *et al.* Auxin-Induced Elongation Growth and Expressions of Cell Wall-Bound Exo- and Endo-Glucanases in Barley Coleoptiles. *Plant Cell Physiol.*, v.41, n.11, p.1272-1278, 2000.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J. *et al.* Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.*, v.6, n.12, p.1244-51, 2004.
- KUMAR, A. *et al.* Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Rec. Res. Sci. Technol.*, v.4, n.1, p.1-5, 2012.
- LACAVAL, P.T.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Evaluation of endophytic colonization of *Citrus sinensis* and *Catharanthus roseus* seedlings by endophytic bacteria. *J. Microbiol. (Seoul, Korea)*, v.45, n.1, p.11-14, 2007.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINTO, R.S. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Rev. Tróp. Ciênc. Agrárias Biol.*, v.4, n.2, p.12, 2010.
- LEYVAL, C.J.B. Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots : Influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil*, v.117, p.103-110, 1989.
- LIMA, S.A. *et al.* Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, v.35, n.3, p.713-721, 2011.
- LIN, T. *et al.* Genetic Diversity of Antagonistic Endophytic Bacteria Isolated from *Sophora alopecuroide*. *Plant Dis. Pests*, v.2, n.4, p.6-8, 2011.
- LUO, S. *et al.* Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.89, n.5, p.1637-1644, 2011.
- LUZ, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. *Fitopatol. Bras.*, v.26, n.1, p.16-20, 2001.
- MA, Y. *et al.* Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants: effects on plant growth and Ni uptake. *J. Hazard. Mater.*, v.195, p.230-237, 2011.
- MELO PEREIRA, G. V. *et al.* A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. *Microb. Ecol.*, v.63, n.2, p.405-17, 2012.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.170, n.1, p.265-270, 1999.
- NYAMBURA NGAMAU, C. *et al.* Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa spp.*) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v.6, n.34, p.6414-6422, 2012.
- PATEL, D. *et al.* Growth Enhancement of Chickpea in Saline Soils Using Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J. Plant Growth Regul.*, v.31, n.1, p.53-62, 2011.
- PICCOLI, P. *et al.* An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A1 and A3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regul.*, v.64, n.2, p.207-210, 2011.
- PRÉVOST, D.; JUGE, C. Diversity of *Bradyrhizobium* populations associated to soybean – maize rotations in Québec, Eastern Canada, and their potential to improve growth of both plant species. *Appl. Soil Ecol.*, v.59, p.29-38, 2012.
- QUECINE, M. C. *et al.* Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, n.21, p.7511-7518, 2012.
- RYAN, R.P. *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.278, p.1-9, 2008.
- SALVAUDON, L. *et al.* Genetic diversity in natural populations: a fundamental component of plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v.11, n.2, p.135-143, 2008.
- SANTI FERRARA, F.I. *et al.* Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil*, v.353, n.1, p.409-417, 2011.
- SCHULS, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, v.6, p.661-686, 2005.
- SENTHILKUMAR, M. *et al.* Biocontrol Potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. *Curr. Microbiol.*, v.58, p.288-293, 2009.
- TAHA, S. M. *et al.* Activity of phosphate-dissolving bacteria in Egyptian soils. *Plant Soil*, v.31, n.1, p.149-160, 1969.
- TEOTIA, P. *et al.* Endophytic Probiotics and plant health: toward a balanced accost. In: KUMAR, A. *et al.* *Probiotics plant health*. USA: Springer International, 2017. p.383-399.
- USDA, United States Department of Agriculture. Oilseeds: World Markets and Trade, 2017.
- VASSILEVA, M.; VASSILEV, N.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in a soil-plant system. *World J. Microbiol. Biot.*, v.14, p.281-284, 1998.
- YANG, C. *et al.* Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v.5, n.2, p.131-136, 2011.
- ZAKRIA, M. *et al.* Influence of inoculation technique on the endophytic colonization of rice by *Pantoea sp.* isolated from sweet potato and by *Enterobacter sp.* isolated from sugarcane. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v.54, n.2, p.224-236, 2008.