



## I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

### **Deteção de citocininas e giberelinas por bactérias endofíticas associadas com maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*)**

Matus da Silva Nascimento<sup>1</sup>, Rosana Barbosa dos Santos<sup>1</sup>, Felipe Alexandre Tenório<sup>2</sup>, Clayton dos Santos Silva<sup>1</sup>, Tania Marta Carvalho dos Santos<sup>1</sup>, José Ubaldo Lima de Oliveira<sup>1</sup>, João Manoel da Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, BR 104, Rio Largo, Alagoas. E-mail: matus3174@gmail.com, rosanabarbosa@yahoo.com.br, clayton@live.pt, oliveiraubaldo5@ig.com.br, tmcs@ceca.ufal.br

<sup>2</sup> Programa Fitossanitário da Soja – Luís Eduardo Magalhães BA. E-mail: felipetenorio\_@hotmail.com.

<sup>3</sup>Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas. E-mail: joao.manoel@iqb.ufal.br.

**Resumo:** A utilização de micro-organismos é crescente na agricultura, principalmente com a preocupação na sustentabilidade. Objetivou-se por meio desse estudo avaliar qualitativamente a presença de citocininas e giberelinas por bactérias endofíticas associadas a maracujá. Foram utilizados 20 isolados bacterianos endofíticos pertencentes ao gênero *Bacillus*, os quais são depositados na coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia CECA-UFAL. A detecção foi realizada pelo método de inoculação em cotilédones e hipocótilos de pepino. Os isolados foram crescidos em meio de cultura Tryptose Phosphate Broth. As sementes de pepino foram esterilizadas com hipoclorito e água destilada. Em seguida, foram incubadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água, todos devidamente esterilizados. Em seguida, foram selecionados cotilédones e hipocótilos, os quais foram postos em novas placas e adicionado 100µL do sobrenadante dos isolados e incubados por três dias. Após esse período, foram pesados os cotilédones e medido o comprimento dos hipocótilos. Os dados foram submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,01$ ). Todos os isolados foram capazes de produzir giberelinas e citocininas, sendo o c17 o mais eficiente.

**Palavras-chave:** promoção de crescimento, fitormônios, *Bacillus*, simbiose

### **Detection of cytokines and gibberelins by endophytic bacteria associated with passionfruit plants (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*)**

**Abstract:** The use of microorganisms is increasing in agriculture, especially with concern for sustainability. The objective of this study was qualitatively to evaluate the presence of cytokines and gibberellins by endophytic bacteria associated with passionfruit plants. Twenty bacterial endophytic isolates belonging to the genus *Bacillus* were used, which are deposited in the collection of microorganisms of the Laboratory of Microbiology CECA-UFAL. Detection was performed by the inoculation method on cucumber cotyledons and hypocotyls. The isolates were grown in Tryptose Phosphate Broth medium. The cucumber seeds were sterilized with hypochlorite and distilled water. They were then incubated in Petri dishes containing filter paper moistened with water, all properly sterilized. Next, cotyledons and hypocotyls were selected, which were placed in new plates and added 100 µL of the supernatant of the isolates and incubated for three days. After this period, the cotyledons were weighed and the length of the hypocotyls measured. The data were submitted to analysis of variance ( $p \leq 0.01$ ) by software R. All the isolates were able to produce gibberellins and cytokines, with c17 being the most efficient.

**Keywords:** growth promotion, phytohormonium, *Bacillus*, symbiosis



## I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

### INTRODUÇÃO

Muito têm se discutido acerca de alternativas para incremento da produção agrícola com base na conservação ambiental e tecnologias sustentáveis. Nesse aspecto, a utilização de micro-organismos é uma alternativa comumente utilizada para sanar as problemáticas relacionadas à produção vegetal. Estes, por sua vez, têm sido prospectados com a finalidade de se obter recursos para fins biotecnológicos (AZEVEDO, 2014) e alternativas sustentáveis.

Dentre os micro-organismos atualmente aplicados em processos para finalidades agrícolas, encontram-se os endofíticos, os quais Azevedo e Araújo (2007) descrevem como aqueles que colonizam o interior das plantas, podendo ser encontrados em órgãos e tecidos vegetais saudáveis e sem causar danos à planta hospedeira.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de se conhecer sua diversidade e funcionalidade. Assim já é descrita na literatura a associação simbiótica entre bactérias endofíticas e várias espécies de plantas cultivadas como mandioca (LEITE et al., 2018), cana de açúcar (SILVA et al., 2015), maracujá (SANTOS et al., 2017, SILVA et al., 2018) e outras plantas como as nativas (FREITAS et al., 2016). Essa associação está atrelada às suas funcionalidades como promotoras de crescimento em plantas por meio de vários mecanismos.

Dentre as formas de atuação das bactérias endofíticas promotoras de crescimento em plantas, destaca-se a promoção ou estímulo da produção de hormônios vegetais ou reguladores de crescimento, os quais são substâncias sintetizadas pela própria planta e atuam na diferenciação e desenvolvimento celular. Os cinco principais grupos de hormônios vegetais são auxinas, etileno, ácido abscísico, citocininas e giberelinas (SAHARAN; NEHRA, 2011).

Segundo Montaldo (2016) as giberelinas são altamente influentes na germinação e quebra de dormência, agindo como estimulante biológico em plantas. As citocininas são sintetizadas nas raízes e tecidos jovens e também por micro-organismos associados às plantas (MONTALDO, 2016).

Diante do exposto, objetivou-se por meio desse estudo, avaliar o potencial de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* associadas a plantas de maracujá amarelo para promoção de crescimento vegetal por meio da produção de giberelinas e citocininas.

### MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, 20 isolados bacterianos endofíticos isolados de plantas de maracujá amarelo foram inoculados em meio de cultivo líquido Tryptose Phosphate Broth. Após a inoculação, os erlenmeyers foram incubados sob agitação mecânica contínua por 24h para obtenção de células jovens. Os isolados utilizados no estudo são pertencentes ao gênero *Bacillus* e devidamente depositados na coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Para a produção de giberelinas e citocininas, adotou-se o método proposto por Catellan (1999). Para tanto, sementes de pepino foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro estéril umedecido com água destilada esterilizada e incubadas no escuro à temperatura ambiente por um período de 72h. Em seguida, os cotilédones e hipocótilos foram separados e os cotilédones e hipocótilos foram colocados nas placas de Petri contendo papel de filtro acrescido com 100µL do sobrenadante de cada isolado, e água destilada para o tratamento controle.

Cotilédones menores foram colocados com parte das nervuras viradas para baixo e colocados ao lado



## I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

### Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

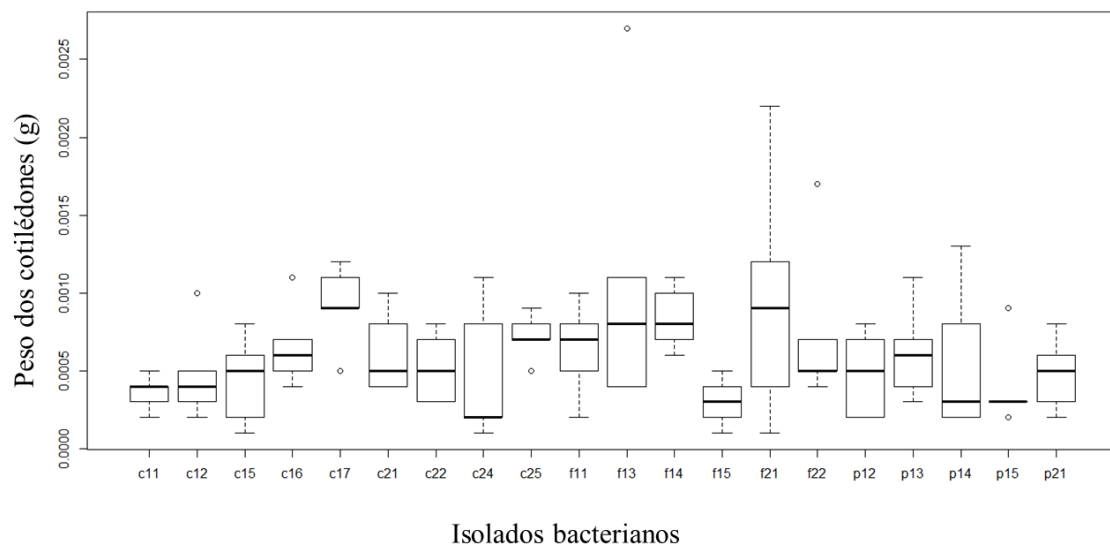
do hipocótilo 5 mm de cotilédones. As placas foram incubadas à temperatura ambiente sob luz fluorescente fraca contínua. Após três dias, cotilédones e hipocótilos foram secos com papel absorvente estéril, pesados em balança analítica e medidos, onde o peso foi comparado com o tratamento controle, o qual não recebeu adição de sobrenadante dos isolados bacterianos endofíticos. O sobrenadante de isolados que produziam citocininas promoveu o peso nos cotilédones, mas não favoreceu o crescimento de hipocótilos, enquanto os isolados que produziram ambas (giberelinas e citocininas) promoveram o ganho de peso dos cotilédones e aumentando do comprimento dos hipocótilos, simultaneamente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância

(ANOVA) e os tratamentos comparados entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ) por meio do software RStudio (RStudio Team, 2016) utilizando-se da linguagem R (R CORE TEAM®, 2018).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da análise dos dados, constatou-se a presença de giberelinas e citocininas mediadas pela inoculação dos isolados bacterianos estudados, denotando também a existência de significância estatística entre estes ( $p \leq 0,01$ ). Assim, foi evidenciada a presença de giberelinas por meio do aumento do peso dos cotilédones (Figura 1) e a presença de citocininas por meio do aumento do comprimento dos hipocótilos (Figura 2).



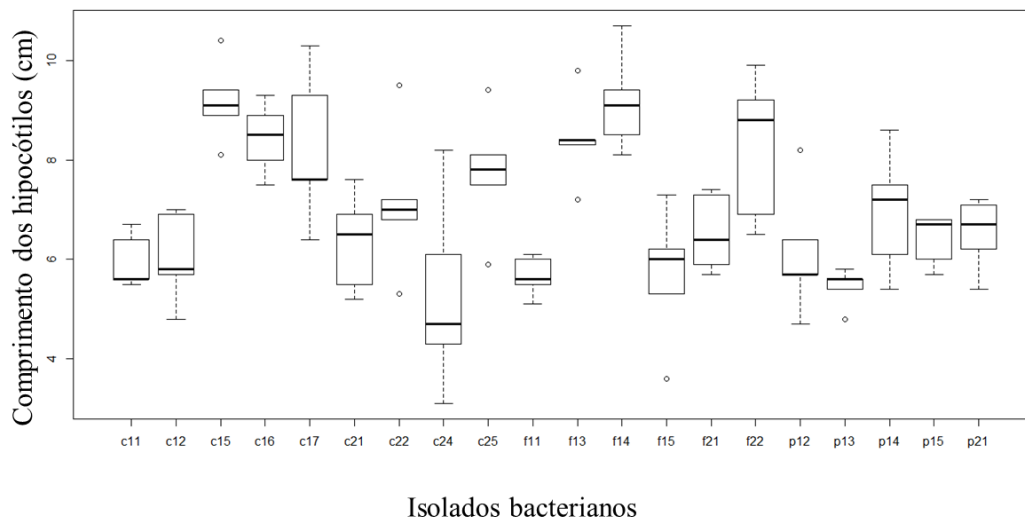
**Figura 1.** Peso de cotilédones de pepino após inoculação por bactérias endofíticas de maracujá após três dias de incubação.



## I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas



**Figura 2.** Comprimento de hipocótilos de pepino após inoculação por bactérias endofíticas de maracujá após três dias de incubação.

Analisando os dados, percebe-se que a maioria dos isolados possui maior produção de citocininas do que giberelinas. Os dados apontam o isolado c15 como o maior produtor com maiores valores de aumento no comprimento dos hipocótilos, seguido dos isolados c16, c17, f14 e f22. Para as giberelinas, o isolado que apresentou maior desempenho foi o c17, destacando-se dos demais com os maiores pesos de cotilédones.

Assim, Montaldo (2016) afirma que a produção destes hormônios vegetais é um dos mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento em plantas por meio de efeitos estimulatórios. Hormônios vegetais ocorrem naturalmente em plantas, influenciando seus processos fisiológicos, logo, citocininas e giberelinas atuam na divisão e alongamento celular e proporciona o desenvolvimento de frutos (SILVA et al., 2015).

Pesquisas com agentes microbianos como bactérias endofíticas proporcionam conhecimento técnico e científico sobre fontes para processos que auxiliam a sustentabilidade

agrícola, por meio do uso destes microorganismos como mediadores de crescimento vegetal.

## CONCLUSÕES

Bactérias endofíticas isoladas de plantas de maracujá amarelo são capazes de produzir ou induzir a produção de giberelinas e citocininas, conferindo-as como bactérias promotoras de crescimento vegetal.

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J. L. **Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications.** In: KHARWAR, R. N.; UPADHYAY, R.; DUBEY, N.; RAGHUWANSH, R. (eds) *Microbial diversity and biotechnology in food security*, Springer, New Delhi, p. 17-22, 2014.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants.** In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Org.). *Fungi:*



## I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

multifaceted microbes. Boca Raton: CRC Press, p. 189-207, 2007.

CATTELAN, J. A. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal.** Londrina, Embrapa Soja, 1999.

FREITAS, A. D. G.; SOUZA, A. G. L.; MAKI, C. S.; PEREIRA, J. O.; SILVA, N. M. Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o fungo simbiote *L. gongylophorus*, e dos fungos associados presentes nos ninhos de *Atta sexdens*. **Scientia Amazonia**, v. 5, n.1, p.1-14, 2016.

LEITE, M. C. B. S.; PEREIRA, A. P. A.; SOUZA, A. J.; ANDREOTE, F. D.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. AGRONOMIA Bioprospection and genetic diversity of endophytic bacteria associated with cassava plant. **Revista Caatinga**, v.31, n.2, p.315-325, 2018.

MONTALDO, Y. C. **Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para promoção de crescimento vegetal.** 103f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Rede Nordeste de Biotecnologia – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. (2018).

RStudio Team **RStudio: Integrated Development for R.** RStudio, Inc., Boston, MA. (2016). Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medical Research**, v.21, p.1-30, 2011.

SANTOS, M. S.; ORLANDELLI, R. C.; POLOMIO, J. C.; RIBEIRO, M. A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Endophytes isolated from passion fruit plants: molecular identification, chemical characterization and antibacterial activity of secondary metabolites. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.7, n.4, p.38-43, 2017.

SILVA, C. S.; TENÓRIO, F. A.; SILVA, J. M.; GUEDES-CELESTINO, E. L.; ARAÚJO, R. G. V.; LIMA, J. R. B.; MONTALDO, Y. C.; SANTOS, T. M. C. Solubilização de fosfatos inorgânicos por bactérias endofíticas isoladas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). **Encontro Regional de Agroecologia do Nordeste**, v.1, n.1, p.1-5, 2018.

SILVA, J. M.; SANTOS, T. M. C.; ALBUQUERQUE, L. S.; MONTALDO, Y. C.; OLIVEIRA, J. U. L.; SILVA, S. G. M.; NASCIMENTO, M. S.; TEIXEIRA, R. A. O. Potential of the endophytic bacteria (*Herbaspirillum* spp. and *Bacillus* spp.) to promote sugarcane growth. **Australian Journal of Crop Science**, v.9, n.8, p.754-760, 2015.