

UTILIZAÇÃO DE AIA NA ELICITAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS DE *BUTIA ARCHERI* A *RHIZOCTONIA* SP.

Bárbara Gonçalves Cruvinel¹; Fellipe Oliveira da Silva²; Ana Flavia da Souza Rocha³; Lidiane Maria dos Santos Moreira⁴; Luciana Cristina Vitorino⁵; Layara Alexandre Bressa⁵.

¹Graduanda em Engenharia Ambiental – Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde– GO, barbaracruvinel.rv@gmail.com;

²Graduando em Agronomia do IF Goiano - Campus Rio Verde- GO,

³Mestranda em Biodiversidade e Conservação do IF Goiano - Campus Rio Verde- GO;

⁴Graduanda em Biologia do IF Goiano - Campus Rio Verde- GO;

⁵Pesquisadora do IF Goiano - Campus Rio Verde- GO.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam uma das fontes de recursos naturais de fácil manipulação, podendo ser utilizada para o entendimento da natureza de vários processos vitais e problemas relacionados à saúde, à produção de alimentos e à produção industrial, podendo ser estudados em ambientes naturais ou em laboratório. São parte importante dos ecossistemas, devido ao papel crucial na transformação de energia e a participação em processos biogeoquímicos (CERIGIOLI, 2005).

O controle biológico tem sido também uma das aplicações desta microbiota. Alguns fungos são produtores de substâncias secundárias, que podem atuar como inibidores de herbivoria (Venugopalan ; Srivastava, 2015; Musavi et al., 2015). Outros microrganismos sintetizam biomoléculas que podem auxiliar no controle biológico de fitopatógenos (*e.g.* Aktar et al., 2014; Parmar et al., 2015).

Embora microrganismos endofíticos e rizosféricos tenham sido amplamente testados para o controle de fitopatógenos, mecanismos que possam estimular o metabolismo destes microrganismos a aumentarem a secreção de compostos de antibiose têm sido pouco avaliados. Van der Meij et al. (2018) observaram que a exposição subsequente de isolados endofíticos a hormônios vegetais encontrados tipicamente em raízes e tecidos de *Arabidopsis* estimula a produção de antibióticos contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Desta forma, este trabalho teve como objetivo testar o efeito do fitormônio ácido indol acético – AIA, sobre o potencial antibiótico de bactérias endofíticas radiculares e rizosféricas isoladas da palmeira *Butia archeri*, na supressão do fitopatógeno *Rhizoctonia* sp..

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Foram utilizados isolados bacterianos pertencentes à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano campus Rio Verde. Estes foram previamente obtidos a partir de fragmentos radiculares e da rizosfera de *B. archeri*. Foram testados 88 isolados bacterianos endofíticos e 25 rizosféricos.

Obtenção dos fitopatógenos

Foram empregados nos testes, fungos fitopatogênicos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano campus Rio Verde. Os fitopatógenos testados foram: *Rhizoctonia* sp. .

Seleção preliminar de isolados com atividade antagonista *in vitro*

A atividade antagonista preliminar foi avaliada em triplicata para cada isolado. Para isso, discos de 6 mm de diâmetro de colônias dos fitopatógenos foram inoculados na região central de placas de Petri contendo meio BDA (Agar dextrose batata) suplementado com AIA.

Foram avaliadas 04 concentrações do elicitor. Para isso, foram preparadas soluções de AIA nas concentrações filtradas de 0.1 e 1.0µM. Estas concentrações estimadas para 1 L de meio de cultura foram diluídas em 100 ml de H₂O destilada e filtradas em membrana millipore de 0.22 µm. O filtrado foi adicionado a 900 ml do meio de cultura teste. Riscos das colônias bacterianas Foram dispostos em raio (04 isolados por placa) e as culturas incubadas a 28°C, durante 7 dias. A capacidade antagonista foi evidenciada por diminuição no desenvolvimento do micélio do fitopatógeno na direção da bactéria simbiótica avaliada. Os isolados que demonstrarem potencial neste teste preliminar foram testados na etapa seguinte.

Análise da capacidade antagonista *in vitro*

Para isso foi realizada a técnica de cultura pareada utilizando-se discos de 6 mm de diâmetro de colônias dos fitopatógenos e um risco de 6 cm de colônia bacteriana. Os mesmos foram inoculados em polos opostos em placas de Petri (4 cm de distância) contendo meio de cultura BDA suplementado com AIA nas diferentes concentrações informadas acima. As culturas pareadas foram, incubadas a 28°C durante 7 dias. Os testes foram realizados em triplicata, sendo utilizado para controle negativo, somente o fitopatógeno em um polo da placa. A avaliação do potencial para antibiose se deu quando os micélios dos fitopatógenos atingirem, no controle, 6 cm de diâmetro. As interações competitivas foram analisadas segundo a escala de Badalyan et al. (2002). O diâmetro da colônia fungo fitopatogênico foi medido com paquímetro e a porcentagem de supressão de cada bactéria, calculada através do índice de inibição relativo (IR):

$$IR (\%) = \frac{(RC - RX)}{RC} \times 100, \text{ sendo:}$$

RC

RC = raio da colônia do patógeno no tratamento controle.

RX = raio da colônia do patógeno pareada com o isolado endofítico.

No teste final, foram avaliadas 12 bactérias submetidas a duas concentrações de AIA, sendo a inibição avaliada durante quatro tempos 48, 96, 144 e 192 horas. Os dados de IR obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados por teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software Sisvar.

ResultadoS e discussãoNos testes preliminares, de todas as bactérias testadas, com a adição das concentrações de 0.001 µM ou de 0.1µM de AIA, apenas 12 isolados apresentaram potencial inicial de antibiose contra o fungo *Rhizoctonia* sp. sendo 6 delas endofíticas e 6 rizosféricas (Tabela 1).

Tabela 1. Bactérias simbióticas de *Butia archeri* submetidas a teste preliminar de antibiose ao fungo fitopatogênico *Rhizoctonia* sp. e que inibiram positivamente este fungo.

Isolado	Código do isolado
<i>Bacillus</i> sp.	BA88-R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	BA82-E
<i>Rhizobium</i> sp.	BA253-E
Não identificada	BA282-E
<i>Enterobacter aerogenes</i>	BA 83- E
Não identificada	BA 94-R
<i>Rhizobium</i> sp.	BA 185-E
<i>Rhizobium</i> sp.	BA 76-R
<i>Bacillus</i> sp.	BA 122-R
<i>Enterobacter oryzae</i>	BA 123-R
Não identificada	BA 108-R
<i>Enterobacter ludwiggi</i>	BA206-E

Foi observado que a maioria das bactérias testadas, independentemente do tempo de avaliação, expressava potencial de antibiose na menor concentração fornecida de AIA (0.001µM). Das 12 bactérias testadas a que apresentou maior índice de inibição quando elicitada com a concentração de 0.001µM de AIA foi a *Rhizobium pusense* (Im% de 51,656). Contudo, as bactérias *Enterobacter aerogenes* (Im% de 37,776) e *Enterobacter aerogenes* (Im% de 40,537), também demonstraram potencial significativo para a inibição de *Rhizoctonia*

sp. (Tabela 3). Na segunda concentração avaliada (0.1µM). Duas bactérias se destacaram nos testes preliminares, sendo que as mesmas não expressaram potencial de antibiose quando submetidas a concentração inferior de AIA. Estas bactérias foram *Bacillus* sp. (Im% de 9,932) e *Enterobacter ludwiggi* (Im% de 10,773). Em relação ao maior índice de inibição, independentemente do tempo de avaliação, a bactéria que apresentou melhor resultado sob a concentração de 0.1µM de AIA foi também *Rhizobium pusense* (Im% de 36,596), porém, o percentual de inibição relativo destas bactérias, foi inferior, ao ser submetida a esta concentração maior de AIA (Tabela 3). Com isso, conclui-se que o estímulo à antibiose induzido por AIA produziu maior efeito quando a concentração desse fitormônio esteve muito baixa.

Tabela 2. Índices de inibição geral médio do fitopatógeno *Rhizoctonia* sp., por bactérias endofíticas radiculares e rizosféricas de *B. archeri* elicítadas pelas concentrações de 0.001µM e de 0.1µM de AIA (valores obtidos a partir de quatro tempos de avaliação - 48, 96, 144 e 192 horas).

Isolados	Concentração de AIA	
	0.001µM	0.1µM
IR % a <i>Rhizoctonia</i> sp.		
<i>Enterobacter aerogenes</i> (BA82-E)	37,776 b*	29,419 b
<i>Enterobacter aerogenes</i> (BA83-E)	40,537 b	31,263 b
BA94-R	10,393 de	-
<i>Rhizobium</i> sp. (BA185-E)	11,792 de	-
<i>Rhizobium pusense</i> (BA253-E)	51,656 a	36,596 a
<i>Rhizobium</i> sp. (BA76-R)	12,519 de	-
<i>Bacillus</i> sp. (BA122-R)	10,391 cd	11,224 cd
BA282-E	10,439 cd	11,224 cd
<i>Enterobacter oryzae</i> (BA123-R)	37,463 c	-
BA108-R	14,032 de	11,227 de
<i>Bacillus</i> sp. (BA88-R)	-	9,932 de
<i>Enterobacter ludwiggi</i> (BA206-E)	-	10,773 de

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação aos tempos avaliados durante a indução de inibição, para a *Rhizobium pusense* (Im% de 51,656) a bactéria de melhor resultado geral, não foi observado diferença estatística

entre os percentuais de inibição nos diferentes tempos, não havendo, portanto, um pico de resposta à elicitação. O mesmo foi observado para a maioria das bactérias com índices de porcentagem de inibição altos. Indicando que elas mantiveram estável as respostas de antibiose. Contudo, para as linhagens para as quais se observou baixo IR, os melhores percentuais foram verificados às 48 e às 96 horas, havendo nestes períodos, maior supressão do patógeno, independentemente da concentração de AIA testada.

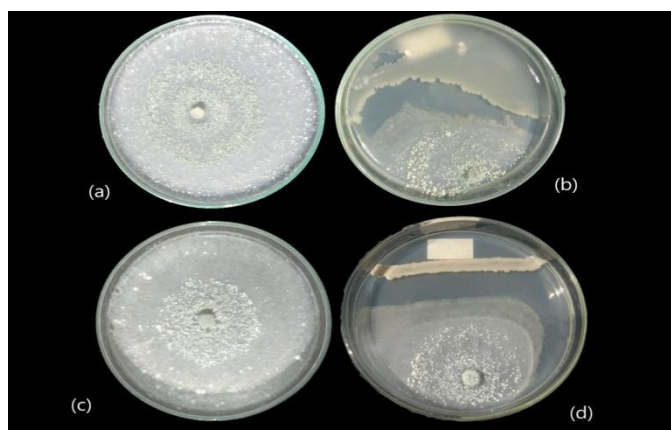


Figura 1. Padrão de desenvolvimento do fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. em ausência de bactérias supressoras (a) na concentração de 0.001μM e (c) na concentração de 0.1μM, bem como na presença da bactéria (b) *Rhizobium* sp. BA253E em 0.001μM e em (d) 0.1μM de AIA.

Bactérias endofíticas e rizosférica constituem uma boa fonte para a prospecção de micro-organismos supressores de patógenos, podendo ser testadas para medidas de controle biológico, a presença de AIA em baixas concentrações pode elicitar o efeito biocontrolador de *Rhizobium pusense*. Este trabalho abre perspectivas para o teste em campo destas bactérias simbióticas, em associação com moléculas indutoras do crescimento, no controle de *Rhizoctonia* sp.

REFERÊNCIAS

- AKTAR, M. T., K. S. HOSSAIN, AND BASHAR, M. A. Antagonistic potential of rhizosphere fungi against leaf spot and fruit rot pathogens of brinjal. *Bangladesh Journal of Botany*. v. 2, p. 213-217, 2014.
- BADALYAN, S.M., et al. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathologia Mediterrânea*. v. 41, p. 200-225, 2002.
- CERIGIOLI, MÁRCIA MACIEL, Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. 2005. 1f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil, 2005.

MUSAVI, S. F., DHAVALA, A., AND BALAKRISHNAN, R. M. Optimization and Kinetic Modeling of Cell-Associated Camptothecin Production from an Endophytic *Fusarium oxysporum* NFX06. ***Preparative Biochemistry and Biotechnology***. v. 45, n. 2, p. 158-172, 2015

PARMAR, H. J., et al. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* strains during in vitro antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of stem rot of groundnut. ***African Journal of Microbiology Research***. v. 9, n. 6, p. 365-372, 2015.

VAN DER MEIJ, A., et al. Inter- and intracellular colonization of Arabidopsis roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 111, p. 679-690, 2018.

VENUGOPALAN, A., SRIVASTAVA, S. Enhanced camptothecin production by ethanol addition in the suspension culture of the endophyte, *Fusarium solani*. ***Bioresource Technology***. v. 188, p. 251-257, 2015.