

Produção de ácido indolacético por *Paenibacillus polymyxa* e atividade antifúngica contra *Fusarium verticillioides*

Talles Henrique Pereira Alves², Gisele de Fátima Dias Diniz³, Luciano Viana Cota, Eliane Aparecida Gomes, Ivanildo Evódio Marriel, Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁴

¹Trabalho financiado pelo CNPq

² Estudante do curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa

³ Universidade Federal de Minas Gerais

⁴ Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

INTRODUÇÃO

Microrganismos promotores de crescimento das plantas (MPCP) conferem diversos benefícios à planta, como fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes e produção de fitormônios (Santner; Estelle, 2009). Além disso, são capazes de produzir compostos antifúngicos e enzimas hidrolíticas que atuam inibindo fitopatógenos (Mabood et al., 2014).

Dentre os fitormônios produzidos pelos MPCP, destaca-se o ácido indolacético (AIA), uma auxina que promove o alongamento de células e estimula a síntese celular, resultando na expansão de raízes laterais e pelos radiculares, aumentando absorção de nutrientes (Taiz; Zeiger, 2004). O AIA pode ser sintetizado por bactérias associadas às plantas, a partir do triptofano que está presente nos exsudatos radiculares em diferentes concentrações dependendo do genótipo da planta (Woodward; Bartel, 2005).

Alguns MPCP apresentam potencial para controlar patógenos de plantas, o que pode representar uma alternativa promissora para reduzir a dependência no uso de agroquímicos e se tornando uma opção segura ao meio ambiente e de baixo custo, comparada aos métodos convencionais (Silva et al., 2003). No caso do milho, um dos principais patógenos que atacam sementes e grãos é o *Fusarium verticillioides* (Ribeiro et al., 2005; Nerbass et al., 2008), provocando apodrecimento do colmo, espiga e raiz, além de produzir toxinas que se acumulam nos grãos (Madrugal et al., 2017). Este patógeno está associado a doenças que geram grandes perdas econômicas em todo o mundo (Desjardins, 2006).

Paenibacillus polymyxa são rizobactérias enquadradas entre os MPCP e possuem uma grande variedade de hospedeiros além da capacidade de formar

endosporos e produzir diversos tipos de antibióticos, que faz dessas bactérias potenciais agentes de biocontrole (Timmusk et al., 2005). Ao gênero *Paenibacillus* são atribuídas propriedades como a capacidade de disponibilizar nutrientes, produzir compostos fenólicos, indólicos e fitormônios (Gardener, 2004; Aswathy et al., 2013; Xin et al. 2017). Portanto, podem atuar simultaneamente como antagonista de patógenos radiculares, como bactérias, fungos, nematoides e ainda como biofertilizante (Bloemberg; Lugtenberg, 2001).

O estudo teve como objetivo verificar a eficiência de isolados de *P. polymyxa* na promoção de crescimento quanto a capacidade de formação de AIA e ação de biocontrole sobre *F. verticillioides*.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de Ácido Indolacético (AIA)

Sete isolados de *P. polymyxa* obtidos do Laboratório de Microbiologia dos Solos da Embrapa Milho e Sorgo foram utilizados para os testes de produção de AIA de acordo com a metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995). Para inoculação foram adicionados 25 μ L do inóculo padronizado a 10^8 UFC/mL em 5 mL de meio TSB (caldo soja tripticaseína) + DL-triptofano na concentração de 1,0 g/L. A incubação foi realizada e mantida a 100 rpm a 30 °C por 5 dias. Em seguida, foi adicionado 100 μ L do reagente Salkowski em cada amostra, conforme protocolo descrito por Gordon e Weber (1951), com algumas modificações, sendo essas incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro. A absorbância foi medida a 530 nm.

Teste de antagonismo contra *F. verticillioides*

Foram utilizados dois isolados do patógeno de milho *F. verticillioides* com grande capacidade de produzir fumonisinas (CML2743) e grande agressividade para plantas de milho (CML2778).

Para o teste de confronto direto, um disco de 5 mm da borda da cultura pura do patógeno foi transferido para o centro de uma placa de Petri contendo BDA (Batata Dextrose Agar). Em quatro pontos equidistantes entre si e do centro foi adicionado 10 μ L de suspensão bacteriana na concentração aproximada de 10^8 UFC.mL⁻¹. A medição do raio da colônia do fitopatógeno foi realizada na presença e ausência dos microrganismos antagonistas cerca de 7 dias após a incubação a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz.

Para o teste de produção de compostos voláteis, em placa de Petri, contendo meio de cultura BDA, foi espalhada uma suspensão de cada isolado crescido por 24 h a 28 °C em meio TSB na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹. Após 48 horas do crescimento dos isolados foi repicado um disco de micélio do patógeno CML2778 no fundo de uma segunda placa contendo o mesmo meio. As placas foram mantidas em incubadora a 28

°C com fotoperíodo de 12 horas. Após 7 dias de incubação foi avaliado o crescimento micelial do patógeno, medindo-se o raio (cm) médio das colônias do patógeno em todos os tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de Ácido Indolacético (AIA)

Os sete isolados de *P. polymyxa* avaliados apresentaram a habilidade de sintetizar AIA ($> 1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de forma moderada e alta (Figura 1). De acordo com a concentração de AIA obtida, temos: $< 1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (baixa produção); $1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (média produção); $11-50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (alta produção) e $>51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (elevada produção) (Kavamura et al., 2013).

Os isolados de *P. polymyxa* LIS 01 ($12,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e LIS 02 ($8,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram maior produção de AIA em relação aos demais isolados avaliados, não havendo diferença significativa entre eles. Os demais isolados apresentaram média produção de AIA, mas inferiores aos valores obtidos para os isolados LIS 01 e LIS 02.

A capacidade de produção de AIA por *P. polymyxa* foi testada por Xu e Kim (2014), que obteve valores um pouco maiores, variando de 8,7 a 22,1 $\mu\text{g/mL}$, de produção desse fitormônio com a adição de L-triptofano. A menor produção de AIA pelos isolados testados nesse trabalho pode ter sido influenciada pelo reagente precursor da reação utilizado, que foi o DL-triptofano.

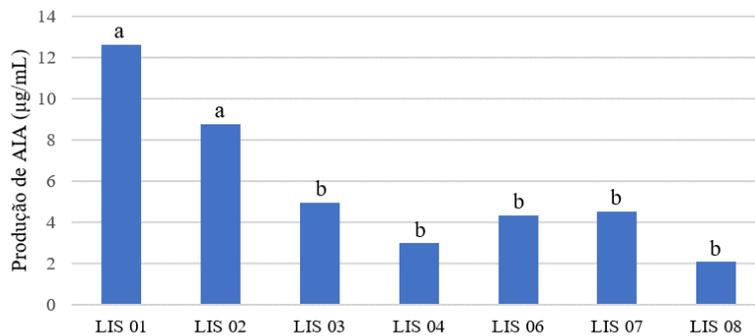


Figura 1. Produção de ácido indolacético (AIA) por isolados de *Paenibacillus polymyxa*. Os valores representam as médias obtidas para as três repetições. As letras diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade

Teste de antagonismo contra *F. verticillioides*

As estirpes que apresentaram maior antagonismo, em confronto direto, foram LIS 08 e LIS 04, ambas com média de inibição igual a 67,5%, quando confrontadas com o isolado CML2743. Para o *F. verticillioides* CML2778 as estirpes LIS 06 e LIS 01 foram as que apresentaram maior antagonismo com 65% de inibição. As demais estirpes

também inibiram o crescimento do fungo com valores variando de 60% a 65% (Tabela 1).

Os isolados apresentaram grande capacidade de inibir *Fusarium verticillioides* pela produção de compostos voláteis, não sendo observado crescimento significativo de hifas no meio de cultura (Figura 2).

A supressão de fungos fitopatogênicos por compostos orgânicos voláteis tem sido descrita por diferentes estudos, que mostraram a possibilidade de aplicação desses compostos na fumigação de solos, sementes, grãos pós-colheita e no tratamento das plantas. Os compostos voláteis atuam principalmente no período de germinação dos esporos do fitopatógeno, ou seja, na fase inicial do seu desenvolvimento o que tende a tornar o controle ainda mais efetivo (Yuan et al., 2012). Além de atuar diretamente sobre os patógenos, os compostos voláteis podem atuar como indutores de defesa sistêmica das plantas e estimular o crescimento vegetal (Tahir et al., 2017; Raza et al., 2016) e, ainda, como atrativo de inimigos naturais, desempenhando um papel importante em sistemas agrícolas sustentáveis (Kanchiswamy et al., 2015). Com relação a atividade antimicrobiana, os metabólitos voláteis apresentam algumas vantagens quando comparados com os compostos não voláteis, pois podem ser facilmente difundidos através da atmosfera e atuar a longas distâncias, aumentando sua eficácia (Maffei et al., 2011).

Tabela 1. Média do raio da colônia e porcentagem de inibição do crescimento de *Fusarium verticillioides* CML2743 e CML2778 em teste de confronto direto entre as culturas e através da produção de compostos voláteis pelos isolados de *Paenibacillus polymyxa*

Tratamento	CML 2743		CML 2778		CML 2778	
	Média	PI* (%)	Média	PI* (%)	Média	PI** (%)
Controle	4,00a	-	4,00a	-	2,36	-
LIS 01	1,70b	57,5	1,42d	65	0	100
LIS 03	1,67b	58,25	1,50c	62,5	0	100
LIS 02	1,67b	58,25	1,50c	62,5	0	100
LIS 06	1,60c	60	1,40d	65	0	100
LIS 07	1,55c	61,25	1,62b	60	0	100
LIS 04	1,32d	67,5	1,50c	62,5	0	100
LIS 08	1,30d	67,5	1,47c	63,5	0	100

*PI = Porcentagem de inibição obtida pelo teste de confronto direto e **PI = Porcentagem de inibição obtida no teste de compostos voláteis entre os isolados de *P.*

polymyxa e *Fusarium verticillioides*. Letras iguais não diferem entre si na coluna pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade

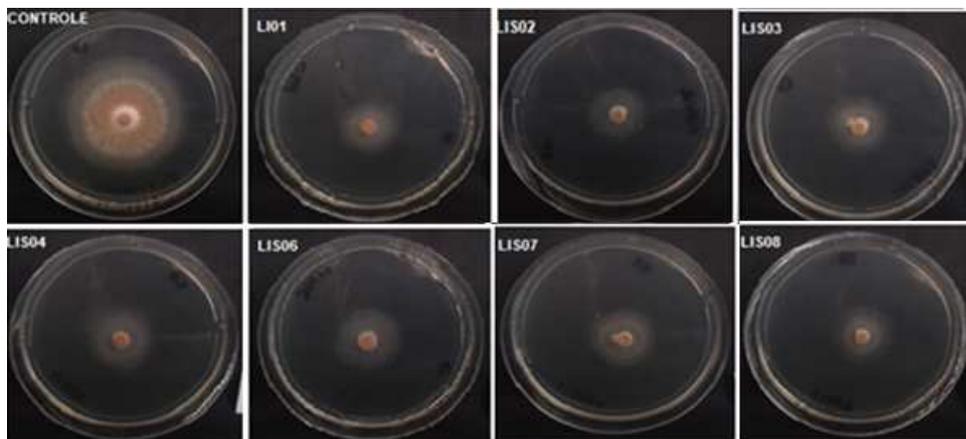


Figura 2. Crescimento de *F. verticillioides* em contato com os compostos voláteis produzidos pelos isolados.

CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos em condições de laboratório com as estirpes de *P. polymyxa* testadas, embora não apresentem elevadas produções de AIA, mostram um grande potencial no uso como agentes de biocontrole contra *F. verticillioides*. Outros parâmetros para classificar essas estirpes como promotoras de crescimento em plantas deverão ser analisados, como a capacidade de fixar nitrogênio e a solubilização de nutrientes. Porém, é sabido que a atividade de qualquer microrganismo pode variar entre as condições estudadas em laboratório e em campo. Portanto, é fundamental continuar com a avaliação da *P. polymyxa* *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ASWATHY, A. J.; JASIM, B.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. K. Identification of two strains of *Paenibacillus* sp. as indole 3 acetic acid-producing rhizome associated endophytic bacteria from *Curcuma longa*. **3 Biotech**, v. 3, n. 3, p. 219-224, 2013.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 4, p. 343-350, 2001.

DESJARDINS, A. E. *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology*. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2006.

GARDENER, B. B. M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1252-1258, 2004.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.

KANCHISWAMY, C. N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M. E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, article 151, 2015.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

MABOOD, F.; ZHOU, X.; SMITH, D. L. Microbial signaling and plant growth promotion. **Canadian Journal Plant Science**, v. 94, n. 6, p. 1051-1063, 2014.

MADRIGAL, K. Y. L.; CASTRO, E. S.; VÁZQUEZ, C. L. C.; CORONA, C. P. L.; MENDOZA, I. E. M. Pathogenic and genetic variability of *Fusarium verticillioides* from maize in northern Mexico. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 486-496, 2017.

MAFFEI, M. E.; GERTSCH, J.; APPENDINO, G. Plant volatiles: production, function and pharmacology. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 8, p. 1359-1380, 2011.

NERBASS, F. R.; CASA, R. T.; ANGELO, H. R. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 1, p. 30-36, 2008.

RAZA, W.; YOUSAF, S.; RAJER, F. U. Plant growth promoting activity of volatile organic compounds produced by biocontrol strains. **Science Letters**, v. 4, p. 40-43, 2016.

RIBEIRO, N. A.; CASA, R. T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E. N.; WILLE, L. A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1003-1009, 2005.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. **Nature**, v. 459, p. 1071-1078, 2009.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 1, p. 42-46, 2003.

TAHIR, H. A. S.; GU, Q.; WU, H.; NIU, Y.; HUO, R.; GAO, X. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, v. article 40481, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROV, N.; WAGNER, E. G. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7292-7300, 2005.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, p. 707-735, 2005.

XIN, K.; LI, M.; CHEN, C.; YANG, X.; LI, Q.; CHENG, J.; ZHANG, L.; SHEN, X. *Paenibacillus qinlingensis* sp. nov., an indole-3-acetic acid-producing bacterium isolated from roots of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 589-595, 2017.

XU, S. J.; KIM, B. S. Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil. **Mycobiology**, v. 42, n. 2, p. 158- 166, 2014.

YUAN, L.; WANG, S.; ZHOU, J.; DU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J. Status of insecticide resistance and associated mutations in Q-biotype of whitefly, *Bemisia tabaci*, from eastern China. **Crop Protection**, v. 31, n. 1, p. 67-71, 2012.