

# Simpósio de Integração Acadêmica

## “Ciências Básicas para o Desenvolvimento Sustentável”

SIA UFV 2023



### *Bacillus* spp. endofíticos com potencial para controle do fitopatógeno da soja *Corynespora cassiicola*

Vilhena L.L.<sup>1</sup>; Queiroz M.V.<sup>1</sup>; Freitas B.C.<sup>1</sup> – <sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal de Viçosa. lorenzo.vilhena@ufv.br, mvqueiro@ufv.br, bruna.caetano@ufv.br

Biocontrole, Metabolismo secundário, Microrganismos

#### Introdução

*Bacillus* spp. endofíticos são capazes de colonizar a planta hospedeira sem causar qualquer dano aparente ao tecido vegetal. O gênero *Bacillus* é conhecido pelos produtos diversificados do seu metabolismo secundário, principalmente os compostos antimicrobianos. Até 8% dos genomas dessas bactérias, incluindo cromossomos e plasmídeos, podem estar envolvidos na produção desses compostos. Essas características são interessantes para aplicação na agricultura, visando ao controle de doenças de culturas de importância agrônômica.

#### Objetivos

Estudos anteriores já demonstraram o potencial antagonístico e de promoção de crescimento de plantas de quatro cepas de *Bacillus* isoladas de *Hevea brasiliensis*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o controle *in vitro* do fungo *Corynespora cassiicola*, agente causal da mancha-alvo na soja (*Glycine max*), e o efeito dos compostos secretados por essas bactérias nas hifas do fitopatógeno, bem como determinar a presença de plasmídeos nativos maiores que 50 kb no genoma das bactérias.

#### Material e Método

O ensaio de antibiose foi realizado por meio do método de cultura pareada (Figura 1). As cepas 18B22C-AM (*B. velezensis*) e 201B16R-AC (*B. proteolyticus*) foram inoculadas a 1,5 cm da borda das placas de petri contendo meio BDA, após 48 horas de incubação à 28 °C, um disco de micélio de *C. cassiicola* foi inoculado no centro das placas, que em seguida foram incubadas à 25 °C por 7 dias. Para a cepa 140B5F-AM (*B. subtilis*), discos de micélio de *C. cassiicola* foram inoculados em placas contendo meio BDA que foram incubadas por 48 horas à 25 °C. Posteriormente, cada placa foi inoculada com uma alíquota de 2 µL, obtida da diluição de 10<sup>-5</sup> de uma cultura líquida em 50 ml de Caldo LB incubada em shaker a 28 °C e 200 rpm por 12 horas. A microgota foi espalhada sob o meio de cultura com o auxílio de uma alça de repicagem, a 1,5 cm de distância da borda da placa. O isolado 174B28R-AM foi inoculado da mesma maneira, entretanto as alíquotas de 2 µL utilizadas para o inóculo desse isolado foram obtidas da diluição de 10<sup>-3</sup> de uma cultura líquida em 50 ml de Caldo LB incubada em shaker a 28 °C e 200 rpm por 3 horas. As placas de ambas as cepas foram incubadas por 7 dias à 25 °C após o inóculo. Para o controle negativo foram usadas placas inoculadas apenas com o fitopatógeno. O teste foi feito com três repetições biológicas. A porcentagem de inibição do crescimento (IC) micelial do fitopatógeno foi calculada aplicando a fórmula:  $IC = [(CT)/C] \times 100$ , em que C é o crescimento micelial do controle (mm) e T é o crescimento micelial nos tratamentos (bactéria + fungo fitopatogênico; mm). Os valores obtidos foram comparados pelo teste de Tukey (p=0,05). Para a observação do efeito dos metabólitos secretados, lâminas contendo cortes das pontas das hifas na região do micélio mais próxima às bactérias foram fotografadas utilizando um microscópio digital, modelo Thermo EVOS M5000 Imaging System (Figura 2). A avaliação da presença de plasmídeos nativos maiores que 50 kb foi feita por meio de eletroforese de gel em campo pulsado (PFGE).

#### Agradecimentos



#### Resultados e Discussão

As quatro cepas testadas foram capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno. As cepas 18B22C-AM e 140B5F-AM inibiram o crescimento micelial em 35,18% e 28,07%, respectivamente. Já as cepas 201B16R-AC e 174B2R-AM tiveram porcentagem de inibição menores, correspondendo a 16,46% e 24,26%, respectivamente. Todas as cepas testadas, com exceção da 201B16R-AC, secretaram compostos no meio de cultura capazes de modificar as hifas do fitopatógeno e induzir a formação de clamidósporos. Não foram detectados plasmídeos maiores que 50 kb. Os ensaios *in vitro* demonstraram que as cepas testadas são capazes de inibir o crescimento do fungo *C. cassiicola* e as modificações observadas nas hifas do fitopatógeno reforçam o potencial antagonístico dessas bactérias. A ausência de plasmídeos maiores que 50 kb indica que os genes que relacionados aos metabólitos secretados devem estar presentes nos cromossomos ou em plasmídeos menores que não foram detectados pela técnica PFGE.



Figura 1. Ensaio de antagonismo *in vitro*: Placas de cultura pareada dos *Bacillus* spp. com *Corynespora cassiicola* e suas respectivas placas de controle, apenas com o patógeno.

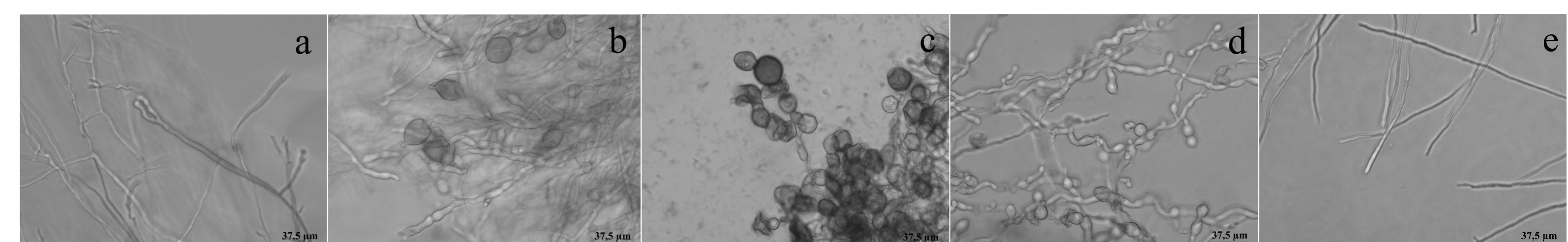


Figura 2. Hifas de *Corynespora cassiicola*. a: hifas do controle. b: hifas da cultura pareada com o isolado 18B22C\_AM. c: hifas da cultura pareada com o isolado 140B5F\_AM. d: hifas da cultura pareada com o isolado 174B28R\_AM. e: hifas da cultura pareada com o isolado 201B16R\_AC.

#### Conclusões

Os ensaios *in vitro* demonstraram que as cepas testadas são capazes de inibir o crescimento do fungo *C. cassiicola* e as modificações observadas nas hifas do fitopatógeno reforçam o potencial antagonístico dessas bactérias. A ausência de plasmídeos maiores que 50 kb indica que os genes que relacionados aos metabólitos secretados devem estar presentes nos cromossomos ou em plasmídeos menores que não foram detectados pela técnica PFGE. Tais resultados demonstram que as cepas analisadas têm potencial para serem utilizadas no biocontrole do fitopatógeno *C. cassiicola*.

#### Apoio financeiro

