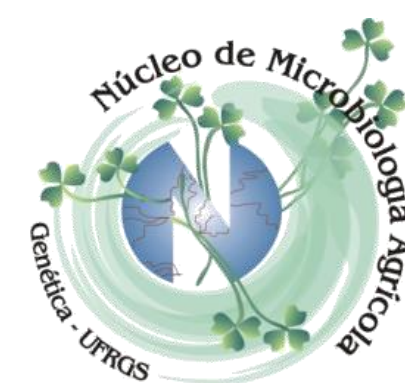




Avaliação de bacilos isolados da rizosfera de girassol quanto à diversidade genética, atividades promotoras de crescimento vegetal e antagonismo à *Sclerotinia sclerotiorum*



¹Thais Stefanski Chaves, ²Adriana Ambrosini, ³Anelise Beneduzi, ⁴Luciane Passaglia

¹Estudante Graduação – Ciências Biológicas/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ²Estudante Doutorado – Depto Genética/UFRGS; ³Pesquisadora – Fepagro, Porto Alegre, RS, Brasil; ⁴Pesquisadora – Depto Genética/UFRGS. e-mail: thais.stefanski@hotmail.com

Introdução

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma oleaginosa que apresenta ampla capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas e elevado rendimento em óleo. Sua importância econômica está relacionada à qualidade nutricional do óleo, apicultura, alimentação animal e produção de biocombustíveis, além da utilização ornamental. Entretanto, o sucesso dessa cultura ainda depende do aumento da produtividade agrícola e do manejo de doenças, como a podridão das raízes, ocasionada pela proliferação do fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*. Diversas espécies de bactérias do solo são capazes de oferecer benefícios às plantas, as chamadas *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Dentre as características que favorecem diretamente o desenvolvimento vegetal destacam-se a fixação de nitrogênio atmosférico, a produção de hormônios vegetais, a solubilização de minerais, a produção de sideróforos e a metabolização da molécula precursora de etileno (ACC). Muitas espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* (Gram-positivas), além de serem PGPRs eficientes, são também conhecidas pela capacidade de inibir a proliferação de micro-organismos fitopatogênicos, através da produção de substâncias antagonistas. O presente trabalho visa à produção de inoculantes microbianos para o benefício do cultivo de girassol, através do emprego de técnicas microbiológicas, moleculares e agronômicas, de forma a obter um produto que vise o aumento da produtividade agrícola de forma sustentável.

Metodologia

1. LOCAIS DE COLETA DO SOLO RIZOSFÉRICO (Fig. 1).



- ★ Encruzilhada do Sul
- ★ São Gabriel
- ★ Vacaria

Figura 1: Mapa do RS e as três regiões amostradas.

2. ISOLAMENTO DE BACILOS: suspensões de solo rizosférico de plantas de girassol em solução salina foram tratadas a 80° C por 10 min e posteriormente inoculadas em placas de Petri contendo meio tiamina-biotina (Seldin *et al.*, 1983; Plant Soil 70:243-255) e incubadas em jarra de anaerobiose durante sete dias a 28°C. Os isolados foram verificados quanto à pureza por meio de coloração de Gram antes de serem estocados em glicerol 50%.

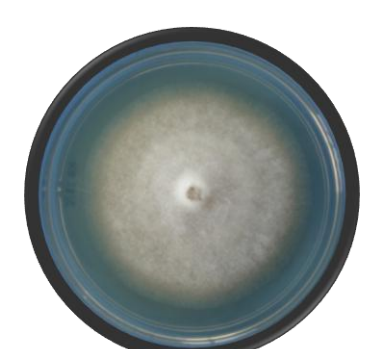
3. EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA: primers Forward (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') (Stackebrandt e Liesack, 1993; Nucleic Acids and Classification) e Reverse (5'AGAAAGGAGGTGATCCAGCC 3') (Edwards *et al.*, 1989; Nucleic Acids Res 17(19):7843-7853).

4. SEQUENCIAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS: a porção inicial do gene 16S rRNA (aproximadamente 800 pb) foi analisada no banco de dados EzTaxon (Goto *et al.*, 2000; J Gen Appl Microbiol 46:1-8).

5. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL:

- ✓ Dosagem da atividade da nitrogenase (ensaio de redução de acetileno por cromatografia gasosa);
- ✓ Produção de compostos indólicos;
- ✓ Produção de sideróforos;
- ✓ Atividade da ACC deaminase;
- ✓ Solubilização de fosfato.

6. AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO CONTRA *S. sclerotiorum*: ensaios preliminares em placa de Petri com meio King-B (Fig. 2).



Controle



B21S (*B. drentensis*)



B27V (*B. thuringiensis*)

Figura 2: atividade de antagonismo *in vitro*.

Resultados

Um total de 120 isolados foram obtidos e até o momento 117 já foram identificados, contando 26 espécies diferentes (Tab. 1). Todos os isolados foram fixadores de nitrogênio *in vitro* e os que apresentaram os maiores níveis de atividade da nitrogenase foram selecionadas para futuros experimentos de inoculação (Tab. 2). Noventa e sete isolados foram capazes de produzir compostos indólicos e três deles de produzir sideróforos. A capacidade de solubilizar fosfato e a atividade de ACC deaminase não foram observadas entre as características analisadas. Os ensaios iniciais demonstraram que 12 isolados apresentaram algum grau de atividade antagonista contra o fungo *S. sclerotiorum* (Tab. 3 e Fig. 2).

Tabela 1: espécies identificadas e sua abundância.

Espécies	Número de Isolados
<i>B. acidicer</i>	3
<i>B. anthracis</i>	1
<i>B. aryabhatai</i>	1
<i>B. cereus</i>	4
<i>B. circulans</i>	2
<i>B. drentensis</i>	21
<i>B. megaterium</i>	4
<i>B. mycoides</i>	1
<i>B. nealsonii</i>	1
<i>B. safensis</i>	1
<i>B. thuringiensis</i>	5
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1
<i>Fontibacillus aquaticus</i>	1
<i>P. alvei</i>	1
<i>P. amylolyticus</i>	6
<i>P. borealis</i>	8
<i>P. glycanilyticus</i>	2
<i>P. illinoisensis</i>	1
<i>P. odorifer</i>	2
<i>P. pabuli</i>	28
<i>P. riograndensis</i>	2
<i>P. sonchi</i>	11
<i>P. tundrae</i>	2
<i>P. xylanexedens</i>	6
<i>P. zanthoxyli</i>	1
TOTAL	117

Tabela 2: os dez isolados com maior capacidade de fixação de nitrogênio *in vitro*.

Espécies (similaridade EzTaxon-e Database)	Estirpe	C ₂ H ₄ mg proteína min ⁻¹
(1°) <i>P. sonchi</i> (98.14%)	B26E	10.770
(2°) <i>P. sonchi</i> (98.18%)	B27E	0.4857
(3°) <i>B. mycoides</i> (99.88%)	B38V	0.1133
(4°) <i>B. thuringiensis</i> (99.75%)	B47V	0.0720
(5°) <i>P. sonchi</i> (97.96%)	B3E	0.0619
(6°) <i>P. sonchi</i> (98.30%)	B14V	0.0131
(7°) <i>P. borealis</i> (97.10%)	B15E	0.0030
(8°) <i>P. pabuli</i> (99.48%)	B14S	0.0025
(9°) <i>P. glycanilyticus</i> (99.75%)	B6E	0.0021
(10°) <i>B. safensis</i> (100.00%)	B24V	0.0018
<i>P. riograndensis</i> (Controle)	SBR5	0.6667
<i>Azospirillum brasilense</i> (Controle) Sp7	Sp7	0.0358

Tabela 3: isolados com algum grau de antagonismo.

Espécies (similaridade EzTaxon-e Database)	Estirpe
(1) <i>B. acidicer</i> (99.43%)	B18E
(2) <i>B. cereus</i> (100.00%)	B3V
(3) <i>B. cereus</i> (99.87%)	B11V
(4) <i>B. drentensis</i> (99.37%)	B27S
(5) <i>B. drentensis</i> (99.40%)	B24S
(6) <i>B. drentensis</i> (99.49%)	B8S
(7) <i>B. drentensis</i> (99.63%)	B21S
(8) <i>B. safensis</i> (100.00%)	B24V
(9) <i>B. thuringiensis</i> (100.00%)	B36E
(10) <i>B. thuringiensis</i> (100.00%)	B30V
(11) <i>B. thuringiensis</i> (99.76%)	B47V
(12) <i>B. thuringiensis</i> (99.88%)	B27V

Perspectivas

Estudos posteriores para o antagonismo contra *S. sclerotiorum* serão realizados por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Além disso, um experimento *in vivo* com diferentes doses (0%, 50%, e 100%) de fertilizante nitrogenado adicionadas ao solo será conduzido, de modo a verificar a capacidade das bactérias de promoverem o crescimento de plantas por meio da fixação de nitrogênio e/ou de outras características benéficas.