

1 **COMPETIÇÃO POR ÍONS FERRO COMO MECANISMO DE CONTROLE DA** 2 **MANCHA-BACTERIANA DO MARACUJÁ POR BACTÉRIAS DO FILOPLANO**

4 BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA¹; DANIEL TERAQ²;

5 KÁTIA DE LIMA NECHET³

7 **INTRODUÇÃO**

8 Dentre as doenças de maior importância do maracujá (*Passiflora edulis* Sims), a mancha-
9 bacteriana é uma das que apresenta maior dificuldade de controle e causa impacto, reduzindo o
10 período de exploração comercial. A doença é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv.
11 *passiflorae* (Xap) capaz de causar danos em folhas e frutos (HALFELD-VIEIRA e NECHET,
12 2006).

13 Assim com outras típicas espécies de *Xanthomonas*, este patógeno é um habitante do
14 filoplano e sobrevive associado às plantas em fase residente, o que provém fonte de inóculo para
15 que cause novas infecções (STALL, et al., 1993). Neste sentido, a exclusão prévia do patógeno no
16 filoplano pode reduzir as chances do estabelecimento de populações residentes e, por conseguinte,
17 suas chances de causar infecção. Um dos meios de exclusão prévia se dá pela falta de nutrientes ou
18 de elementos essenciais ao metabolismo (KARAMANOLI et al., 2011). O papel de bactérias
19 produtoras de moléculas quelantes de íons ferro (sideróforos) pode, portanto, desempenhar papel
20 importante no controle da doença.

21 A partir de duas bactérias nativas de maracujazeiro, capazes de produzir sideróforos e pré-
22 selecionadas *in vivo* para o controle da mancha-bacteriana da cultura, surgiu a necessidade da
23 investigação do efeito dessas moléculas na supressão ao desenvolvimento do patógeno. Portanto, o
24 objetivo deste trabalho foi elucidar se a competição por íons ferro, mediada pelos sideróforos, pode
25 estar relacionada com a capacidade desses antagonistas em exercer o controle biológico da doença.

27 **MATERIAL E MÉTODOS**

28 Foi preparada em água destilada estéril uma suspensão dos dois antagonistas produtores de
29 sideróforos: 29RR e 28SP. A concentração bacteriana foi ajustada a $A_{540}=0,1$ em espectrofotômetro.

¹ Dr., Pesquisador A, Embrapa Meio Ambiente - SP, e-mail: bernardo.halfeld@embrapa.br;

² Dr., Pesquisador A, Embrapa Meio Ambiente - SP, e-mail: daniel.terao@embrapa.br;

³ Dr., Pesquisador A, Embrapa Meio Ambiente - SP, e-mail: katia.nechet@embrapa.br

30 Em metade das placas, semearam-se 100 µL da suspensão, por espalhamento, com alça de
31 Drigalski, na superfície do meio King B (KING et al., 1954), suplementado ou não com 2 µM de
32 Fe²⁺ preparado a partir de FeSO₄ 7H₂O. Após 48 h de crescimento a 27 °C, nas placas semeadas
33 com os antagonistas, foram pipetados 2 mL de clorofórmio interior da tampa das placas de Petri
34 invertidas, mantendo-se por um período de 2 h. Após esse período, estas foram abertas em câmara
35 de fluxo laminar para volatilização do clorofórmio.

36 Foram preparadas suspensões de três isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*
37 (XapSP, XapPA e XapRR) e ajustadas em espectrofotômetro à A₅₄₀=0,1. Uma sobrecamada de 15
38 mL do mesmo meio da camada inferior foi vertida em cada placa e semeados, por espalhamento
39 com alça de Drigalski, 100 µL da suspensão de um isolado de Xap das diluições seriadas a 10⁻⁶ e
40 10⁻⁷. Quatro dias após incubação a 27 °C, o número de unidades formadoras de colônias (ufc) foi
41 contado.

42 Como testemunhas, foram utilizados os meios King B com ou sem a adição de 2 µM de Fe²⁺,
43 sem o cultivo de antagonista na camada basal.

44 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (com ou
45 sem o antagonista x com ou sem a adição de 2 µM de Fe²⁺) com 7 repetições para cada tratamento.
46 A análise estatística foi realizada por meio do proc GLM do software SAS versão 9 e do teste
47 Fischer-LSD a 5% de significância.

48

49

RESULTADOS E DISCUSSÃO

50 Os dados demonstram que, para ambos os antagonistas, a suplementação com Fe⁺² suprimiu
51 o efeito inibitório ocasionado pelos sideróforos sobre o crescimento de Xap, porém de formas
52 distintas a se comentar.

53 Para o antagonista 29 RR, foi verificado que, somente em situação de carência de íons ferro,
54 o antagonista suprimiu totalmente o crescimento de todos os três isolados de Xap. Na ausência do
55 antagonista, as colônias do patógeno se desenvolveram normalmente, seja em meio suplementado
56 ou não por sulfato ferroso (Tabela 1).

57 Os resultados indicam que o sideróforo é a molécula responsável pela inibição, pois o
58 antagonista, quando cultivado em meio com suplementação de ferro, apresentou redução
59 significativa na sua capacidade de inibição de Xap em comparação a quando foi cultivado em meio
60 não suplementado com ferro. A adição de íons ferro *per si* não influenciou o crescimento de
61 colônias de Xap, conforme constatado no tratamento controle com adição de 2 µM de Fe²⁺.

62 **Tabela 1-** Influência do sideróforo produzido pelo antagonista 29RR no desenvolvimento de
 63 unidades formadoras (ufc) de colônias para três isolados de *X. a. pv. passiflorae*.

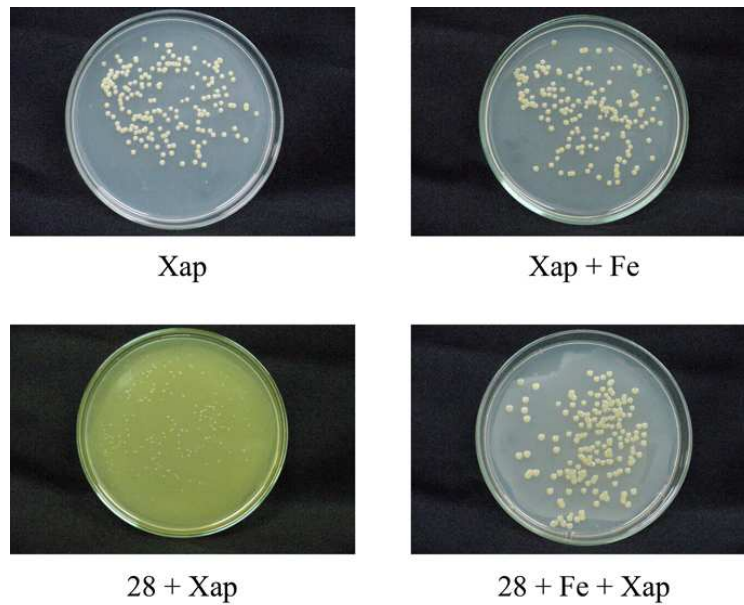
	Isolado de <i>X. a. pv. passiflorae</i> na sobrecamada	Meio B de King suplementado com 2 μM Fe^{2+}	Meio B de King não suplementado com 2 μM Fe^{2+}
Sem antagonista na camada basal	XapRR	19.08 Aa	18.99 Aa
Antagonista 29RR na camada basal	XapRR	18.97 Aa	0.00 Bb
Sem antagonista na camada basal	XapPA	18.28 Aa	18.08 Aa
Antagonista 29RR na camada basal	XapPA	18.71 Aa	0.00 Bb
Sem antagonista na camada basal	XapSP	18.92 Aa	19.02 Aa
Antagonista 29RR na camada basal	XapSP	18.69 Aa	0.00 Bb

64 Unidades formadoras de colônias por 100 μL foram transformadas para Ln ($\text{ufc} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$). Valores
 65 são médias de 7 repetições por tratamento. Médias seguidas de letras diferentes no sentido da linha
 66 ou na coluna por letras maiúsculas, são significativamente diferentes de acordo com o teste Fisher -
 67 LSD ($P \leq 0.05$).

68

69 Para o antagonista 28 SP, todos os tratamentos foram estatisticamente iguais, portanto não se
 70 observou redução do número de ufc para nenhum dos três isolados de Xap (dados não
 71 apresentados). Porém, em situação de carência de íons ferro, na presença do antagonista na camada
 72 basal, foi observado atraso no crescimento das colônias e redução dos seus tamanhos em relação aos
 73 demais tratamentos (Figura 1). Tem sido demonstrado que em situações de carência de íons ferro
 74 em filoplano, há considerável redução nas populações epifíticas de bactérias (KARAMANOLI et
 75 al., 2011), o que pode incorrer em exclusão de Xap pelos antagonistas aqui estudados e explicar
 76 como estes controlam a mancha-bacteriana em maracujá.

77



78

79 **Figura 1-** Desenvolvimento de colônias de Xap quando: na presença do antagonista 28 SP, em
 80 meio suplementado (28 + Fe + Xap) e não suplementado com íons ferro (28 + Xap) e na ausência
 81 do antagonista 28 SP, em meio suplementado (Xap + Fe) e não suplementado com íons ferro (Xap).

82

83

CONCLUSÕES

84 A competição por íons ferro é fator limitante para o desenvolvimento de colônias de
 85 *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, logo, os antagonistas podem interferir no processo
 86 infectivo, o que explica como estes atuam no controle da mancha-bacteriana.

87

88

REFERÊNCIAS

89 HALFELD-VIEIRA, B.A.; NECHET, K.L. Ocorrência da mancha bacteriana do maracujazeiro em
 90 Roraima. Fitopatologia Brasileira, Lavras, v.31, n.2, p.214, 2006.

91 KARAMANOLI, K.; BOULIGARAKI, P.; CONSTANTINIDOU, H.-I.A.; LINDOW, S.E.
 92 Polyphenolic compounds on leaves limit iron availability and affect growth of epiphytic bacteria.
 93 Applied Environmental Microbiology, Washington, v.159, n.1, p.99-108, 2011.

94 KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin
 95 and fluorescein. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, Milwaukee, v.44, n.2, p.301-307,
 96 1954.

97 STALL, R.E.; GOTTWALD, T.R.; KOIZUM, M.; SCHAAD, N.C. Ecology of plant pathogenic
 98 Xanthomonads. In: *Xanthomonas*. SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (Eds.), London: Chapman and
 99 Hall, 1993. p.265-299.