



## Biotecnologia Ambiental

### BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE MILHO (*Zea mays* L.) E POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium moniliforme* e *Pythium aphanidermatum*

\*FLÁVIA MANDOLESI PEREIRA DE MELO<sup>1,2</sup>, ITAMAR SOARES DE MELO<sup>2</sup>, SHIRLEI SCRAMIN<sup>2</sup>, CESAR ROBERTO DE ROSSO<sup>2</sup>, MARCELA TEODORO<sup>2</sup>, GABRIELA GONÇALVES<sup>2</sup>, LUIZ ALBERTO BERALDO DE MORAES<sup>3</sup>, ANA FLÁVIA MARTINEZ<sup>3</sup>, CAROLINE PAMPLONA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia- Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo-SP / E-mail: [flamelo@cnpma.embrapa.br](mailto:flamelo@cnpma.embrapa.br)

<sup>2</sup>Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna SP.

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto -SP

<sup>4</sup>Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

## INTRODUÇÃO

Actinobactérias, isoladas de diversas espécies de plantas, têm mostrado potencial na produção de enzimas, antibióticos, fármacos e no uso na agricultura como agentes de controle biológico. Diante da importância desses microrganismos o presente trabalho teve como objetivo fazer o levantamento da biodiversidade de actinobactérias rizosféricas de milhos sadios e avaliar o potencial dessas no biocontrole de doenças de plantas e seus possíveis potenciais biotecnológicos, como a produção de metabólitos secundários bioativos, especificamente antifúngicos e, também, na identificação de substâncias bioativas produzidas por esta classe de microrganismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento de actinobactérias da rizosfera, amostras de solos aderido às raízes foram coletadas da superfície das raízes, até perfazer 1g de solo/ por planta que foi suspenso em 9 ml (1:10) de água destilada esterilizada e homogeneizados a 10.000 g, por 2 minutos. As amostras foram submetidas a uma diluição em série em solução salina ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ). Foram isoladas 68 linhagens de actinobactérias de plantas sadias de milho, cultivado em diferentes regiões edafoclimáticas do Estado de São Paulo (Ribeirão Preto, Socorro e Serra Negra). A identificação taxonômica dessas linhagens foi feita pelo perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) e 16s rDNA. As linhagens isoladas e identificadas foram submetidas a um screening, teste de antagonismo, para que se avaliasse o potencial de controle dos fungos fitopatogênicos, *Fusarium moniliforme* e *Pythium aphanidermatum* pela medida do halo de crescimento miceliano. As linhagens que mostraram eficiência na inibição dos patógenos foram selecionadas e colocadas para crescer em meio líquido, Batata Dextrose, para que os seus metabólitos secundários fossem liberados no meio líquido (Melo & Sanhueza, 1995). Os metabólitos produzidos por fermentação foram extraídos com solvente, acetato de etila. Os extratos obtidos foram submetidos a um teste de antibiose frente aos fungos fitopatogênicos testados. As linhagens que apresentaram grande potencial de inibição frente aos fungos testes foram submetidas a uma análise do seu perfil molecular para identificação dos genes multifuncionais responsáveis pela produção de compostos antibióticos (sintetases de policetídeos PKS e NRPS), usando oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados (Rabello, 2003). Os extratos orgânicos ativos contra os fungos testes foram separados, analisados e identificados quimicamente por diferentes técnicas cromatográficas, dentre as quais cromatografia em coluna SEPHADEX-LH20, Cromatografia em camada delgada, Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear de  $C^{13}$  e  $H^1$  (RMN) (Collins, et al., 1997).



## Biotecnologia Ambiental

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos sobre a biodiversidade das actinobactérias são de extrema importância, visto que esses microrganismos formam esporos e conídios, permitindo a sua sobrevivência em condições adversas. Além disso, as actinobactérias se destacam pela possibilidade de sintetizar substâncias inibidoras da atividade enzimática (Taguchi et al., 1993), antibióticos e outros compostos biologicamente ativos (Wellington et al., 1994). Desta forma, na rizosfera, as populações de actinobactérias apresentam grande importância ecofisiológica para as plantas e para as demais populações com as quais interagem. Neste trabalho foram isoladas 68 linhagens de actinobactérias de rizosfera de milho sadio. Destes isolados 27 apresentaram atividade antifúngica frente aos fungos *Fusarium moniliforme* e *Pythium aphanidermatum*. Os extratos orgânicos obtidos das 27 linhagens, extraídos com solvente acetato de etila, apresentaram halos de inibição significativos (Tabela 1) frente aos mesmos fungos fitopatogênicos testados e as linhagens que mais se destacaram foram CCMA-30 e CCMA-33. A melhor forma encontrada de estimar o potencial de biossíntese de metabólitos secundários nos táxons das actinobactérias foi a da detecção dos genes NRPS e PKS usando oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados. Por este método molecular a presença do gene PKS foi detectado em 25 linhagens e o gene NRPS foi detectado em 4 linhagens, as 27 linhagens isoladas foram identificadas pelo 16s rDNA e pelo FAME e em sua maioria constatou-se a presença do gênero *Streptomyces*, sendo *Streptomyces griseorubiginosus* a linhagem CCMA-30 com similaridade de 99,39% e *Streptomyces griseorubiginosus* a linhagem CCMA-33 com similaridade de 98,89%. Pela técnica SEPHADEX LH-20 obteve-se 4 frações ativas do extrato orgânico CCMA-30 e 3 frações ativas do extrato CCMA-33, as quais foram submetidas a uma nova separação por cromatografia em camada delgada, onde a melhor mistura de solventes para separação foi acetato de etila, hexano e metanol nas proporções de 35:10:5. Após separação pela CCD as frações foram submetidas a uma análise química pela técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência para análise do perfil dos compostos das frações ativas, comparados ao perfil do extrato bruto. Posteriormente as frações foram injetadas em um Cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (CL/EM), onde se pôde obter o valor exato dos pesos moleculares de cada fração, sendo utilizado a comparação com uma biblioteca específica. Para observação da morfologia das actinobactérias isoladas, estas foram visualizadas por Microscopia eletrônica de varredura (Figura 1).

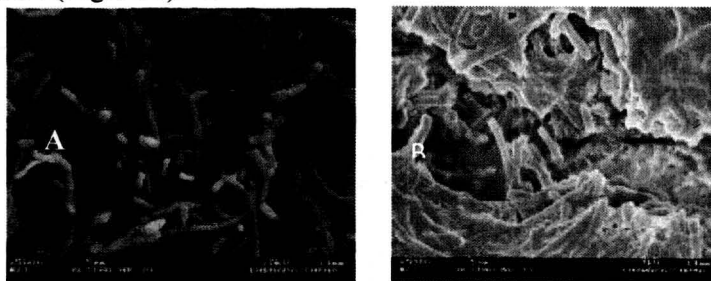


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura das linhagens CCMA 30 (A) e CCMA 33 (B) mostrando a abundância de conídios e septos que caracterizam a morfologia de actinobactérias.



## Biotecnologia Ambiental

Tabela 1: Teste de antibiose frente ao fungo fitopatogênico, *Pythium aphanidermatum*

Extratos orgânicos	Halo de inibição (cm)	Extratos orgânicos	Halo de inibição (cm)	Extratos orgânicos	Halo de inibição (cm)
02 CCMA	0,32	<b>*30 CCMA</b>	<b>2,15</b>	46 CATI	0,35
04 CCMA	0,48	31 CCMA	0,8	52 CCMA	0,40
06 AG1051	0,52	32 CCMA	0,63	53 AL30	0,86
10 AG1051	0,56	<b>*33 CCMA</b>	<b>1,95</b>	56 CCMA	0,75
12 AL30	0,45	34 CCMA	0,45	57 CCMA	0,80
16 CATI	0,35	35 CCMA	0,80	58 CCMA	0,75
20 CCMA	0,40	39 AG1051	1,20	60 CCMA	0,65
22 AL30	0,49	41 AG1051	0,50	71 CCMA	0,35
27 CCMA	0,9	44 AL30	0,45	72 CCMA	0,60
Controle	5,0	Controle	5,0	Controle	5,0

### CONCLUSÕES

Aproximadamente 40% das actinobactérias isoladas de milho inibiram a germinação do micélio de fungos fitopatogênicos (*P. aphanidermatum* e *F. moniliforme*) causadores de podridões radiculares de milho, possivelmente devido à produção de compostos bioativos. *Streptomyces griseorubiginosus* (CCMA-30) e *Streptomyces griseorubiginosus* (CCMA-33) apresentaram o maior efeito inibitório de crescimento dos fungos patogênicos testados. O solvente acetato de etila apresentou alta eficiência na obtenção de extratos com atividades antifúngicas das actinobactérias. O método cromatográfico CL/EM apresentou capacidade de resolução suficiente que permitiu a identificação de substâncias antifúngicas produzida pelas duas linhagens de actinobactérias, as quais serão confirmadas com auxílio de RMN. Estudos posteriores serão realizados a termo, objetivando na compreensão da ecofisiologia destes microrganismos na rizosfera das plantas cultivadas e, conseqüentemente, incrementos na produtividade agrícola.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinobactérias. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 352, 1998.
- COLLINS, et al. **Introdução a métodos cromatográficos**. UNICAMP, 7ª ed., São Paulo, p.65-185, 1997.
- WELLINGTON, et al. Actinomycetes. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY, P. S., (Ed.). **Methods of soil analysis**. 3.ed. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.269-290.
- MELO, I.; SANHUEZA, R. Métodos de Seleção de Microorganismos Antagônicos a Fitopatogênicos: **Manual Técnico**. EMBRAPA-CNPMA, 1995.
- TAGUCHI, et al. *Streptomyces subtilis* inhibitor-like proteins are distributed widely in Streptomyces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4338-4341, 1993.

**APOIO FINANCEIRO:** Bolsista – CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)