

Efeito antagonista de células e exsudatos de *Chromobacterium violaceum* contra fungos patogênicos de sementes de soja e contra a lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera:Noctuidae)

Eriana Serpa Barreto¹; Rodrigo Masel Capeletti Cioato²; Marliton Rocha Barreto³; Mariangela Hungria⁴. ¹Bolsista de DTI do CNPq; ²Bolsista de ITI do CNPq; ³Doutorando na Embrapa Soja; ⁴Embrapa Soja.

Introdução

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria saprófita, Gram-negativa e aeróbica facultativa, encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes. No Brasil, ocorre com abundância na água e nos bancos de areia do Rio Negro, na Região Amazônica. A cor do pigmento produzido por *C. violaceum*, a violaceína, representa uma de suas características mais atrativas. A violaceína apresenta atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp. e, também, atividade antifúngica, antiviral e antitumoral (Durán et al., 2001). Essas características levaram à escolha da estirpe-tipo ATCC 12472, isolada de águas fluviais frescas em Mentekab, Malásia, como modelo para ser o primeiro microrganismo a ter seu genoma completamente seqüenciado por um consórcio de laboratórios de âmbito nacional (Projeto Genoma Brasileiro MCT/CNPq). O seqüenciamento revelou um cromossomo circular com 4.751.080 pares de bases e 4.429 "open reading frames" (ORFs), tendo sido identificadas 2.715 proteínas conhecidas, 958 hipotéticas conservadas e 756 proteínas hipotéticas (Vasconcelos et al., 2003).

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta grande importância econômica para o Brasil, mas pode ser limitada por diversos patógenos de sementes que, inclusive, praticamente inviabilizam a semeadura sem

o uso de defensivos agrícolas em diversos locais do país (Araújo, 1995). Em relação aos fungos patogênicos, as estimativas atuais são de que, desde a safra 2001/2002, o tratamentos de sementes de soja com fungicidas vem sendo utilizado em mais de 93% da área semeada no Brasil (Henning, 2004). Já em relação a insetos, a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera:Noctuidae), é uma das principais pragas desfolhadoras de plantas de soja, sendo alvo da maior parte das aplicações de inseticidas na cultura (Secchi, 2002).

Objetivos

Verificar a atividade biocida das células e dos exsudatos da estirpe padrão e de dois isolados de *Chromobacterium violaceum* da Amazônia contra fungos patogênicos de sementes de soja e contra a lagarta-da-soja.

Material e Métodos

A atividade biocida da estirpe padrão e de dois isolados selecionados, 07 e 27, bem como de seus respectivos exsudatos foi testada contra sete fungos patogênicos de sementes de soja (*Aspergillus* sp., *Cercospora kikuchi*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp., *Corynespora* sp. e *Botryodiplodia* sp.). Esses fungos estão relacionados a doenças importantes na cultura da soja, como a queima-da-haste (*Phomopsis* sp.), a antracnose (*Colletotrichum* sp.) e a síndrome da morte súbita (*Fusarium* sp.). Duas metodologias foram utilizadas para avaliação da atividade antifúngica, segundo Araújo (1995), com modificações. Na primeira, os fungos foram inoculados, por meio de discos com micélio, em quatro pontos equidistantes em placas de Petri contendo meio BDA (200g de batata, 12g de glicose em 1.000mL de água destilada, 1,5% de ágar), 24h antes da inoculação das bactérias e do exsudato filtrado. As bactérias foram cultivadas em meio CV contendo 0,6% de cloreto de sódio, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 0,25% de glicose dissolvidos em água destilada, durante 24h, a uma temperatura de 28 a

30°C, com agitação de 100 rpm. A seguir, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato pH 6,5 e ressuspensas no mesmo tampão, até atingir a concentração de 10⁸ células mL⁻¹. Para o tratamento com os exsudatos, as bactérias foram cultivadas nas mesmas condições já citadas e centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min, procedendo-se à filtração do sobrenadante em filtro do tipo Millipore (0,2 µm). No orifício central da placa foram colocados 80 µL de cada cultura de célula, ou do respectivo sobrenadante filtrado. Os ensaios foram conduzidos com três repetições e as placas incubadas à temperatura de 28°C durante sete dias. Após esse período, foram avaliados os halos de inibição da bactéria e do exsudato em relação aos fungos. Na segunda metodologia, a bactéria foi inoculada em um círculo externo e os discos contendo os micélios foram colocados na parte central da placa de Petri. No caso de ausência de atividade biocida, os fungos continuam a crescer, mesmo na presença da bactéria, ou do exsudato.

A habilidade inseticida da estirpe padrão, dos isolados 07 e 27, e de seus respectivos exsudatos também foi testada contra a lagarta-da-soja. As bactérias foram cultivadas em meio CV. Os tratamentos utilizados continham culturas com 24h, 48h e 72h de crescimento, conforme sugerido em Martin et al. (2004), em diluições de 10⁹-10¹² células mL⁻¹, em tampão fosfato pH 6,5, e os respectivos exsudatos foram esterilizados por filtração em membrana com 0,45 µm de poro. Os controles foram feitos com água destilada e meio de cultura CV.

As lagartas foram alimentadas com dieta artificial de Hoffmann-Campo et al. (1985). O experimento foi realizado segundo Barreto et al. (1999). No bioensaio foram testadas 20 larvas de 2^ª ínstar da lagarta da soja para cada tratamento. Cada pedaço de dieta (2 cm x 0,8 cm x 0,5 cm) foi embebido nas suspensões contendo as bactérias e nos respectivos exsudatos e foi oferecido às larvas, as quais foram mantidas em copos plásticos de 50 mL com tampa, a uma temperatura e umidade relativa aproximadas de 25°C e 50%, respectivamente. A cada 24 ou 48h foi acrescentada nova dieta e o tempo de exposição às bactérias e aos exsudatos foi de 24h para todos os tratamentos. A mortalidade foi acompanhada diariamente, durante todo o período larval.

Resultados

Os ensaios iniciais mostraram atividade antagonista promissora, principalmente contra os fungos *C. kikuchi*, *Colletotrichum* sp. e *Corynespora* sp. A atividade biocida foi confirmada utilizando a segunda metodologia, com o fungo crescendo na parte central da placa. Essa segunda metodologia também se mostrou mais eficaz na avaliação da atividade antifúngica. É interessante observar que o potencial antifúngico dos dois isolados da Amazônia foi superior ao da estirpe padrão, e que os tratamentos com as culturas de células foram mais eficientes quando comparados aos tratamentos com os exsudatos. Shirata et al. (2000) demonstraram uma atividade inibitória da violaceína produzida por *Janthinobacterium lividum*, que foi particularmente forte contra *Colletotrichum dematium* e *Rosellinia necatrix*, os quais causam antracnose e o apodrecimento branco das raízes de amoreira, respectivamente. Esse resultado ratifica a existência de atividade fungicida da violaceína, também produzida pelas células de *C. violaceum*.

Não foi verificada atividade inseticida de *C. violaceum* contra a lagarta da soja em nenhum dos tratamentos. Também não foi verificado qualquer tipo de inibição no desenvolvimento da lagarta. As bactérias púrpuras tais como *C. violaceum* não são, frequentemente, isoladas de insetos e, também, não são consideradas seus patógenos, mas foi verificado, por Martin et al. (2004), que a estirpe PRAA4-1 de *Chromobacterium* sp., isolada em Maryland, nos Estados Unidos, é tóxica às larvas do besouro da batata do Colorado (Coleoptera: Chrysomelidae), o que demonstra a capacidade inseticida desse tipo de bactéria e reforça a necessidade de busca de novos métodos para sua utilização no controle biológico de pragas agrícolas.

Considerações Finais

Houve indicação de atividade biocida em *Chromobacterium violaceum* contra fungos fitopatógenos de sementes de soja, mas não foi observada atividade inseticida contra a lagarta da soja.

Agradecimentos

Financiado parcialmente pelo CNPq (680.220/00-5). Os autores agradecem a Fábio F. Araújo, à Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos (LNCC) pelo apoio na condução do projeto e a Daniel Sosa-Gómez pela utilização do Laboratório de Patologia de Insetos (Embrapa Soja). As estirpes da Amazônia foram isoladas pelo grupo do Prof. Spartaco Astolfi-Filho (Universidade Federal do Amazonas). As lagartas foram fornecidas pelo Laboratório de Criação Massal de *Anticarsia gemmatalis* (Embrapa Soja).

Referências

- ARAÚJO, F.F. Efeito de *Bacillus* spp. e seus metabólitos na competitividade e na nodulação da soja (*Glycine max* [L] Merrill) por *Bradyrhizobium* spp. 111f. Dissertação de mestrado – Departamento de Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 1995.
- BARRETO, M.R.; LOGUERCIO, L.L.; VALICENTE, F.H.; PAIVA, E. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, São Paulo, v.28, n.4, p.675-685, 1999.
- DURÁN, N.; RETTORI, D.; MENCK, C.F.M. Quem é a *Chromobacterium violaceum*? *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n.20, p.38-43, 2001. (Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>.).
- HENNING, A.A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51p. (Embrapa Soja. Documentos, 235).
- HOFFMAN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 1985. 23p (Embrapa Soja. Documentos, 10).
- MARTIN, P.A.W.; BLACKBURN, M.; SHROPSHIRE, A.D.S. Two new bacterial pathogens of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, Maryland, v. 97, n.3, p.774-780, 2004.
- SECCHI, V.A. Baculovírus, mais do que uma grande descoberta: uma

revolucionária alternativa aos agrotóxicos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.3, n.3, p. 49-54, 2002.

SHIRATA, A.; TSUKAMOTO, T.; YASUI, H.; HATA, T.; HAYASAKA, S.; KOJIMA, A.; KATO, H. **Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing**, 1999. Disponível em: [http://ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/jarq/34-2/shirata/34-2\(8-2\).htm](http://ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/jarq/34-2/shirata/34-2(8-2).htm). Acesso em 01 dez. 2004.

VASCONCELOS, A.T.R.; ALMEIDA, D.F.; HUNGRIA, M.. 106 other authors. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.100, p.11660-11665, 2003.