

NOTA CIENTÍFICA

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM AÇÃO ANTAGÔNICA A FITOPATÓGENOS

SELECTION OF ENDOPHYTIC BACTERIA WITH ANTAGONIC ACTION AGAINST PLANT PATHOGENS

Humberto Franco SHIOMI¹
Itamar Soares de MELO²
Marli Teixeira de Almeida MINHONI³

RESUMO

Muitos métodos rápidos e eficientes de seleção de agentes de biocontrole de fitopatógenos tem sido utilizados, visando reduzir tempo e custo dispendido em testes de campo. Neste trabalho realizou-se uma seleção de isolados endofíticos com potencial de uso no biocontrole de fitopatógenos em testes de antagonismo *in vitro*. De um total de 95 isolados de bactérias endofíticas do milho, seis foram selecionados quanto à inibição a *Pythium aphanidermatum*. A essa seleção, foram incluídos um isolado de *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus* e *Streptomyces* sp., para verificação de antagonismo a *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii* e *Exserohilum turcicum*. Verificou-se que os endofíticos *B. subtilis* 0G, *B. lentimorbus* e *Streptomyces* sp., apresentaram ação antagonônica superior aos demais, com taxas de inibição entre 32,0% e 53,8%. Dentre os endofíticos do milho, *Bacillus agaradhaerens* foi o que mais se destacou, com taxas de inibição variando entre 43,7% e 52,3% e indicando uma inespecificidade de ação. Este estudo, embora preliminar, permite vislumbrar a utilização desses endofíticos na supressão de doenças em diferentes sistemas patógeno-hospedeiro em testes subseqüentes, sob condições de casa-de-vegetação e a campo.

Palavras-chave: controle biológico; doenças de plantas; antagonismo.

ABSTRACT

Several fast and efficient methods of selection of biocontrol agents of plant diseases has been used, to reduce time and cost expended in the field tests. This work took place a selection of isolated endophytics with potential for use in biocontrol of plant pathogens in tests of antagonism *in vitro*. Out of a total of 95 isolates of bacteria endophytic maize, six were selected on the inhibition to *Pythium aphanidermatum*. In this selection, were included one isolate of *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus* and *Streptomyces* sp. For verification of antagonism to *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii* and *Exserohilum turcicum*. It was found that the endophytics *B. subtilis* 0G, *B. lentimorbus* and *Streptomyces* sp. showed more antagononic action to the other, with inhibition rates of between 32,0% and 53,8%. Among the endofíticos maize, *Bacillus agaradhaerens* was what stood out most, with rates of inhibition ranging between 43,7% and 52,3%, indicating a inespecificity of action. This study, though preliminary, to see the use of such endophytics to the elimination of diseases in different host-pathogen systems in subsequent tests under conditions of house-to-vegetation and field.

Key-words: biological control; plant diseases; antagonism.

¹ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia, Professor Colaborador do Departamento de Agronomia da UNICENTRO, CP 3010, 85015-430, Guarapuava-PR; E-mail: hfshiomi@yahoo.com.br . Autor para correspondência.

² Engenheiro agrônomo, Doutor em Agronomia, Pesquisador da CNPMA/EMBRAPA, CP 69, 13820-000, Jaguariúna-SP, E-mail: itamar@cnpma.embrapa.br

³ Professora Doutora do Departamento de Defesa Fitossanitária da FCA/UNESP, CP 237, 18603-970, Botucatu-SP, E-mail: marliminhoni@fca.unesp.br

INTRODUÇÃO

Recentemente, o interesse pela utilização de microrganismos endofíticos como ferramentas de biocontrole de fitopatógenos nos diferentes agroecossistemas tem aumentado em importância, devido à necessidade de se buscar alternativas viáveis ao uso de agroquímicos e dos problemas decorrentes de sua utilização indiscriminada, como a contaminação ambiental, dos alimentos e dos consumidores, o aparecimento de populações resistentes de patógenos e diminuição de populações de organismos benéficos ou não-alvos (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003; SILVA et al., 2004).

Os microrganismos endofíticos compreendem, principalmente, fungos e bactérias que habitam o interior das plantas sem causar, aparentemente, danos aos seus hospedeiros (PETRINI, 1991). A sua capacidade de biocontrole pode advir de vários mecanismos, como a produção de substâncias deletérias aos fitopatógenos (M'PIGA et al., 1997) ou competindo por espaço e nutrientes. Indiretamente, pela produção de substâncias promotoras de crescimento (VARMA et al., 1999) ou induzindo resistência sistêmica no hospedeiro (VAN LOON et al., 1998).

Com o objetivo de se obter agentes de controle biológico potencialmente eficientes, um grande número de antagonistas têm sido pré-selecionados em testes de antagonismo *in vitro*, devido às dificuldades apresentadas pelos métodos de seleção realizados a campo, como o custo, mão-de-obra, tempo e espaço necessários serem elevados (XIUJUN et al., 1996).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo realizar uma seleção de bactérias endofíticas do milho, com potencial de uso como agentes de biocontrole, através de testes de antagonismo *in vitro*, frente a fitopatógenos desafiantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Noventa e cinco isolados de bactérias endofíticas do milho, provenientes da coleção de culturas da EMBRAPA - Meio Ambiente foram submetidos a uma seleção massal, realizada através de testes de antagonismo *in vitro*, frente ao fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.. Os endofíticos foram dispostos na forma de estria, eqüidistantes e nas extremidades das placas. No centro, foi colocado um disco de 0,5 cm de diâmetro, contendo a cultura do patógeno. Uma placa contendo apenas um disco com micélio do fitopatógeno no centro, serviu de tratamento controle. O período de tempo necessário para que o micélio do patógeno tomasse toda a superfície da placa, serviu de parâmetro para indicar o momento de avaliar a inibição, realizada através de análise visual, e em apenas uma repetição por isolado.

Após essa seleção, os isolados mais promissores foram identificados através da análise do perfil dos ácidos graxos da membrana da parede

celular, em cromatógrafo a gás, conforme o descrito por SASSER, 2001 (Tabela 1) e testados quanto ao antagonismo a *Fusarium moniliforme* Sheldon, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. e *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. A esses testes, também foram incluídos um isolado das bactérias endofíticas *Bacillus subtilis* 0G (Ehrenberg) Cohn e *Bacillus lentimorbus* Dutky e *Streptomyces* sp. Waksman & Henrici, selecionados em estudos anteriores, quanto à sua ação antagonista a fitopatógenos.

Um disco de meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro, contendo um isolado de um patógeno, foi colocado em uma das extremidades da placas de Petri contendo meio BDA. Na outra extremidade, uma estria contendo propágulos do isolado endofítico. O tratamento controle consistiu da colocação, sobre a placa de Petri, de apenas um disco de meio de cultura contendo o fitopatógeno. O momento de avaliação do halo de inibição, foi estabelecido como o período de tempo necessário para que o micélio do patógeno, sem a presença do endofítico, se desenvolvesse sobre todo o meio de cultura. Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 repetições e os dados submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os isolados mais promissores, foram identificados *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus agaradhaerens* Nielsen, *Streptomyces* sp. e *Escherichia coli* Escherich GC subgrupo B. Embora *Streptomyces* sp. não tenha inibido o crescimento micelial de *S. rolfsii*, verificou-se que este isolado, juntamente com *B. subtilis* 0G e *B. lentimorbus*, apresentaram atividade antagonista superior aos demais, com taxas de inibição entre 32,0% e 53,8% (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por MELO e VALARINI (1995), que observaram uma forte ação antagonista de *B. subtilis* 0G sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e *R. solani*, em testes *in vitro*. Em testes *in vivo*, o isolado apresentou um controle de 100% sobre a podridão radicular em plantas de pepino, causada por *F. solani*. Da mesma forma, AMORIM e MELO (2002) observaram a inibição do crescimento micelial de *Phytophthora parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian pela ação de *B. subtilis* 0G e *B. subtilis* RC2, na ordem de 52% em testes *in vitro*. Em plântulas de citros, *B. subtilis* 0G e *B. subtilis* RC2 conferiram uma proteção de 100% e 85,7%, respectivamente. Segundo os mesmos autores, os mecanismos envolvidos no controle desses patógenos estariam relacionados à produção de compostos tóxicos (antibiose) e de sideróforos (competição por ferro). SHIOMI et al. (2006) verificaram a supressão da ferrugem do cafeeiro, em testes de germinação de

uredíniosporos, discos de folhas, folhas destacadas e em plântulas de café por *B. lentimorbus*. Muitas linhagens de *Streptomyces* ou seus produtos são conhecidos por suprimir o crescimento de fitopatógenos, tanto em testes sob condições de laboratório, como de campo (TREJO-ESTRADA et al., 1998; SABARATNAN e TRAQUAIR, 2002).

Dentre os endofíticos do milho, *Bacillus agaradhaerens* e *Escherichia coli* apresentaram as maiores taxas de inibição aos patógenos desafiantes (43,7% a 52,3%) e (13,6% a 44,3%), respectivamente. Alguns trabalhos demonstram a capacidade de *B. agaradhaerens* em produzir

enzimas extracelulares como endoglucanases (HIRASAWA et al., 2006; MELANDER et al., 2006), relacionadas à degradação da parede celular de fitopatógenos como *Phytophthora cinnamomi* Rands e *Phytophthora fragariae* Hickmann (VALOIS et al., 1996).

Este estudo, embora preliminar, indica uma inespecificidade de ação por parte dos endofíticos sobre fitopatógenos e permite vislumbrar o seu uso na supressão de doenças em diferentes sistemas patógeno-hospedeiro, em testes subsequentes, pelo tratamento de sementes ou de plantas sob condições de casa-de-vegetação e de campo.

TABELA 1 – Identificação dos microrganismos endofíticos do milho mais promissores, obtidos por seleção massal, quanto ao perfil de ácidos graxos da membrana da parede celular (FAME).

Código	Identificação	Índice de similaridade ¹	Matriz de isolamento
P10F2	<i>Escherichia coli</i> Escherich GC subgrupo B	0,574	Folha
P10F4	<i>Morganella morganii</i> (Winslow) Fulton	0,650	Folha
P10F5	<i>Ewingella americana</i> Grimont	0,539	Folha
14F4a	<i>Xanthomonas axonopodis</i> Hasse	0,529	Folha
16F2g	<i>Microbacterium imperiale</i> Steinhaus	0,806	Folha
12R2 d/a	<i>Bacillus agaradhaerens</i> Nielsen	0,892	Raiz

¹ parâmetro de semelhança entre a amostra e a biblioteca do programa MIDI – Sherlock Microbial Identification System

TABELA 2 – Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos por microrganismos endofíticos em testes de antagonismo *in vitro*.

Tratamento	<i>R. solani</i>		<i>S. rofsii</i>		<i>F. moniliforme</i>		<i>E. turcicum</i>	
	R.C. ¹ (cm)	I.R. ² (%)	R.C. (cm)	I.R. (%)	R.C. (cm)	I.R. (%)	R.C. (cm)	I.R. (%)
Controle	6,33a*	0,00	6,63a*	0,00	6,50a*	0,00	7,22a*	0,00
P10F2	4,27b	32,54	5,73b	13,57	4,33c	33,38	3,20c	44,32
P10F4	4,47b	29,38	6,00ab	9,50	3,93cd	39,54	3,80c	47,57
P10F5	4,20b	33,65	5,90ab	11,01	4,07c	37,38	4,32bc	40,17
14F4a	5,93a	6,32	6,00ab	9,50	6,07ab	6,61	4,97b	31,16
16F2g	6,13a	3,16	6,30a	4,98	5,37b	17,38	5,05b	30,06
<i>B. subtilis</i> 0G	3,23c	48,97	3,80c	42,68	3,00e	53,84	3,85bc	46,68
<i>B. lentimorbus</i>	3,23c	48,97	3,70c	44,19	3,23de	50,31	3,55c	50,83
<i>Streptomyces</i> sp.	4,33b	32,00	6,13ab	7,54	3,53cd	45,69	4,05bc	43,91
12R2 d/a	3,56c	43,76	4,40b	33,63	3,10e	52,31	3,65c	49,45
CV (%)	4,54		4,87		6,64		11,05	

* Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

¹ Raio médio da colônia

² Inibição relativa, onde:

I.R. (%) = $\frac{(RC-RX)}{RC} \times 100$, sendo:

RC

RC = raio da colônia do patógeno no tratamento controle

RX = raio da colônia do patógeno pareada com o isolado endofítico

CONCLUSÕES

1) Nas condições desse experimento, as bactérias endofíticas *Bacillus subtilis* 0G e *Bacillus lentimorbus*, apresentaram maior potencial de uso como agentes de biocontrole de fitopatógenos.

2) De 95 isolados de bactérias endofíticas do milho testados, *Bacillus agaradhaerens* e *Escherichia coli* GC subgrupo B, se revelaram os mais promissores como agentes de controle biológico de fitopatógenos.

REFERÊNCIAS

1. AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagonica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.
2. CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279 p.
3. HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIWA, M.; GRANT, W.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.; HORIKOSHI, K. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, n. 2, p. 211-219, 2006.
4. MELANDER, C.; ADDEN, R.; BRINKMALM, G.; GORTON, L.; MISCHNICK, P. New approaches to the analysis of enzymatically hydrolyzed methyl cellulose. Part 2. Comparison of various enzyme preparations. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1410-1421, 2006.
5. MELO, I. S.; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum*). **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.
6. M'PIGA, P.; BÉLANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, n. 5, p. 301-320, 1997.
7. PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 179-197.
8. SABARATNAN, S.; TRAQUAIR, J. A. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia solani* damping-off in tomato transplants. **Biological Control**, v. 23, n. 3, p. 245-253, 2002.
9. SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. Newark: Midi Inc., 2001. 6 p. (Technical Note, 101).
10. SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. S.; NUNES, F. V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 32-39, 2006.
11. SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and enzyme activities. **Biological Control**, v. 29, n. 2, p. 288-295, 2004.
12. TREJO-ESTRADA, S. R.; PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, D. L. Antibiotics and enzymes produced by the biological agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 81-90, 1998.
13. VALOIS, D.; FAYAD, K.; BARASUBIYE, T.; GARON, M.; DÉRY, C.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1630-1635, 1996.
14. VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.
15. VARMA, A.; VERMA, S.; SUDHA, S. N.; BÜTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2741-2744, 1999.
16. XIUJUN, Z.; SHIXIANG, W.; YI, Z.; QI, Z. Screening biocontrol agents for *Pythium*-induced disease by germinating carrot seeds in Petri dish – a rapid and effective method. In: WENHUA, T.; COOK, J.R.; ROVIRA, A. **Advances in Biological Control of Plant Diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p. 140-144.

Recebido em 13/12/2007

Aceito em 01/10/2008

