



**POTENCIAL DE *Pseudomonas* sp. PSICROTOLERANTES ISOLADAS DA
ANTÁRTICA NO BIOCONTROLE DE *Botrytis cinerea*.**

BRENO H. **BETIM**¹; WALLACE R. **SOUZA**²; SUIKINAI NOBRE **SANTOS**³; MARCIA
M. **PARMA**⁴; VANESSA N. **KAVAMURA**⁵; ITAMAR S. **MELO**⁶.

Nº 11401

RESUMO

A Antártica, por ser um ambiente extremo, comporta micro-organismos que podem ter características interessantes, como crescimento a baixas temperaturas (psicrotolerância), além da produção de compostos antimicrobianos. Como também a possibilidade de aplicação desses micro-organismos no controle de fitopatogenos que se desenvolveu em baixas temperaturas, como é o caso de *Botrytis cinerea*, que ataca dezenas de culturas agrícolas em zonas temperadas. O morango, *Fragaria vesca*, é comumente atacado por este fungo, causando a doença conhecida como podridão cinzenta, principalmente durante a pós-colheita. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi prospectar bactérias isoladas da Antártica e avaliar o potencial de inibição deste fitopatogeno. Assim foram testadas 56 bactérias sendo que 42% apresentaram melhor crescimento a 4°C. 4 dessas pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, sendo que a linhagem 44-4 (*Pseudomonas Syringae*), foi capaz de controlar o desenvolvimento do fungo em morango (4°C). Demonstra-se, portanto, a possibilidade de prospecção de bactérias Psicrófilicas com potencial de reduzir o crescimento de fungos a baixa temperatura. Ensaio estão sendo feitos para elucidação dos compostos químicos responsáveis por este efeito.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Eng. Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP, betim_juniorr@hotmail.com.

² Colaborador: Graduação em Eng. Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP.

³ Colaborador: Doutoranda em Microbiologia Agrícola, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

⁴ Colaborador: Analista do Laboratório de Microbiologia, EMBRAPA Meio Ambiente.

⁵ Colaborador: Doutoranda em Microbiologia Agrícola, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

⁶ Orientador: Pesquisador, EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

ABSTRACT

Antarctica, being an extreme environment, includes micro-organisms that may have interesting features, such as growth at low temperatures (psicrotolerância), besides the production of antimicrobial compounds. As well as the possibility of application of these micro-organisms to control plant pathogens that developed at low temperatures, as is the case of *Botrytis cinerea*, attacking dozens of agricultural crops in temperate zones. The strawberry, *Fragaria vesca*, is commonly attacked by this fungus causing the disease known as gray mold, especially during post-harvest. Thus, the objective was to prospect for bacteria isolated from Antarctica and evaluate the potential inhibition of this pathogen. So were tested 56 bacteria and 42% showed better growth at 4°C. Four of these belonging to the genus *Pseudomonas*, and the line 44-4 (*Pseudomonas syringae*) was able to control the development of the fungus in strawberry (4°C). It is shown so the prospectivity of Psychrophilic bacteria with potential to reduce the fungal growth at low temperature. Tests are being made to elucidation of the chemical compounds responsible for this effect.

INTRODUÇÃO

Antártica é um dos ambientes mais extremos do Planeta, com condições extremas de temperatura, clima, pressão, salinidade, exposição à UV, pH entre outros. Desta forma, os micro-organismos desempenham papel fundamental no transporte de energia e matéria orgânica e muitas vezes constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestre e aquáticos na Antártica. Dentre a flora encontrada podemos citar *Deschampsia* sp. e *Colobanthus* sp., que sobrevivem a este ambiente (DUARTE, 2010).

Os micro-organismos associados às plantas (endofíticos e epifíticos) tornaram-se foco de interesse pela produção de compostos que favorecem a adaptação da planta perante as condições adversas. As substâncias derivadas do metabolismo secundário de bactérias podem apresentar funções específicas, como atividade antimicrobiana, podendo ser utilizadas para controle biológico de pragas na agricultura (CRAGG e NEWMAN, 2005).

A cultura do morango, (*Fragaria vesca*), em países tropicais, podem ser atacadas por vários fungos como *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus* sp. e *Botrytis cinerea*, causando antracnose, fusariose, podridão mole e podridão seca ou mofo cinzento, respectivamente. O fungo coloniza endofiticamente (internamente) as folhas e cálices dos vegetais iniciando a infecção da flor e dos frutos. A podridão seca é bastante comum, afetando mais de 300 espécies de plantas, podendo afetar os frutos em qualquer estágio de desenvolvimento, provocando o seu apodrecimento. Infecções iniciais podem ter início a partir de restos de outras plantas contaminadas. O fungo tem uma fase de infecção latente nos frutos, o que faz com que frutos aparentemente sadios na colheita desenvolvam a podridão durante o período de pós-colheita (KIMATI et al., 1997), mesmo em baixa temperatura quando estes são preservados em câmaras frigoríficas.

As medidas de controle baseiam-se no uso de cultivares mais resistentes ao patógeno e na limpeza e destruição semanal de folhas, flores e frutos com sintomas. O uso do fungo *Gliocladium roseum*, provou exercer controle desta doença. Entre os fungicidas registrados e indicados para o controle do “mofo cinzento”, citam-se: iprodiona, oxiclreto de cobre, procimidona e o tiofanato metílico.

Este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias Psicotolerantes da Antártica capazes de reduzir o desenvolvimento da doença em morangos causado por *Botrytis cinerea*, sob baixa temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

56 Linhagens bacterianas (Epifíticas e Endofíticas) isoladas de *Colobanthus quitensis* e *Dechampsia antarctica*, plantas endêmicas da Antártica, foram utilizadas neste trabalho, visando a busca de novos agentes de biocontrole que atue em baixas temperaturas.

Avaliação de crescimento dos isolados bacterianos sob diferentes temperaturas

Os isolados bacterianos foram cultivados em diferentes meios de cultivo (SM3, PGPY, NA e ISP2) a 4°C, 24°C, 28°C, para avaliação das condições ótimas de crescimento.

Avaliação de atividade antifúngica das linhagens bacterianas contra *Botrytis cinerea*

As linhagens bacterianas foram crescidas em meio TSA por 24 horas a 25°C. O fungo *B. cinerea* foi cultivado por 7 dias em meio BDA (Batata Dextrose Agar). Placas

de Petri com meio TSA (Tryptona-Soja-Ágar) foram utilizadas para teste de antagonismo de acordo com a Figura 01. As culturas foram incubadas por 5 dias a 4°C, 24°C e 28°C para avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes temperaturas.

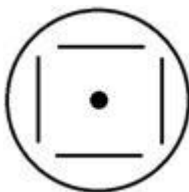


FIGURA 1: Teste de antagonismo, onde os isolados bacterianos foram estriados na forma de linhas paralelas (dois isolados por placa) e disco do micélio de *B. cinerea* disposto no centro da placa.

Identificação taxonômica das linhagens bacterianas pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular

Os isolados foram identificados por meio da técnica de extração de ácidos graxos de acordo com Sasser (1990). Os ácidos graxos foram analisados por um programa de Identificação Microbiana (MIDI, Biblioteca Sherlock® TSBA versão 6.0, Microbial ID, Newark, DE, USA). Os perfis dos ácidos graxos obtidos foram comparados com os dados contidos na biblioteca TSBA 6.0.

Controle de *Botrytis cinerea* in vivo sob baixa temperatura

As linhagens bacterianas selecionadas inicialmente no teste de antagonismo que apresentaram atividade inibitória contra o fungo, foram submetidas à avaliação da atividade antifúngica em frutos de morango.

Preparo do inóculo das linhagens bacterianas selecionadas e do fitopatógeno

As linhagens bacterianas foram crescidas em meio TSB 10% 24 horas. A concentração do inóculo foi ajustada para 10^8 células.mL⁻¹ com solução salina(0,85%). A uma placa com o fungo *Botrytis cinerea*, adicionou-se água destilada autoclavada e retirou-se uma suspensão de esporos 10^5 ufe.mL⁻¹(unidade formadora de esporos).

Montagem do experimento in vivo

Foram utilizados frutos maduros e sadios de *F. vesca*, adquiridos de produtores regionais, e em caixas acrílicas de Gerbox, foram distribuídos 5 frutos, os quais foram submetidos aos seguintes tratamentos: 1 - Morangos imersos na suspensão bacteriana (ISB); 2 - Morangos pulverizados com 3 mL da suspensão fúngica (PSF); 3 - Morangos imersos na suspensão bacteriana e pulverizados com 3

mL da suspensão fúngica (ISB+PSF) e 4 – Controle = Morangos imersos em água destilada autoclavada (IA). Os morangos foram dispostos em caixa de gerbox sob papel filtro umedecido em 2 ml de água destilada para manutenção da umidade. Em seguida, as caixas foram deixadas a temperaturas de 19°C e 4°C e a reação dos sintomas típicos da doença foi avaliada os morangos avaliados a cada 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de crescimento dos isolados bacterianos

Com relação à temperatura de crescimento, a temperatura de 4°C foi a que propiciou melhor o desenvolvimento das culturas, onde cerca de 42% das linhagens apresentaram crescimento pleno. Para a temperatura de 24°C, apenas 21% das bactérias apresentaram crescimento 29% a 28°C. Os micro-organismos podem ser classificados de acordo com o crescimento em diferentes faixas de temperatura, sendo que os psicotróficos (ou psicrotolerantes) são considerados mais versáteis que os psicofílicos, pois crescem não apenas em baixas temperaturas, mas também em moderadas temperaturas assim como os mesofílicos (Ray, 2006). Os micro-organismos psicotróficos e os psicofílicos têm a habilidade de crescer em baixas temperaturas e são encontrados em ambientes como mares profundos, regiões polares e regiões alpinas.

Teste de antagonismo “in vitro”

Somente quatro linhagens bacterianas (8-A, 44-4, 3-6 e 8-B), apresentaram potencial de inibição do fitopatógeno *Botrytis cinerea*, como mostra a **TABELA 02**. Estas linhagens foram selecionadas para ensaio, “in vivo” e identificadas pelo perfil de ácidos graxos.

TABELA 02: Avaliação da atividade antagonista das linhagens bacterianas da Antártica contra *B. cinerea* em diferentes temperaturas.

Linhagem Bacteriana - Identificação	Antagonismo <i>B. cinerea</i>	Teste de crescimento em diferentes temperaturas.		
		4 ^o	24 ^o C	28 ^o C
60	X			
8-A	+	+	+	+
56-A	X	+	-	-
32-A	X	+	-	+
56-B	X	-	-	-
56-A	X	+	+	+
116-1	X	+	-	+
116-2A	X	-	-	-
116-3	X	+	+	-
123-3	X	+	-	+
35-2C	X	-	-	-
35-3	X	-	-	-
35-4	X	+	-	+
43-1A	X	-	-	-
43-2A	X	-	-	-
43-3	X	-	-	-
44-3B	X	+	+	-
44-4	+	+	+	+
51-3	X	-	-	-
51-5	X	-	-	-
52-1	X	+	+	-
52-2	X	-	-	-
53-4A	X	+	+	-
55-1	X	-	-	-
55-2	X	-	-	-
63-1	X	-	-	-
67-1	X	-	-	-
67-3	X	+	-	+
67-4	X	-	-	-
67-5	X	-	-	-
68-2C	X	+	+	-
68-2A	X	-	-	-
71-1	X	-	-	-
72-7A	X	-	-	-
84-2A	X	-	-	-
84-3A	X	-	-	-
88-1	X	-	-	-
88-2A	X	+	-	+
3-6	+	+	+	+
4-1A	+	+	-	+
8-B	+	+	+	+
17-1	X			
19-1	X	-	-	-
20-1B	X	+	-	-
23-1	X	-	-	+
27-1A	X	-	-	-
27-2A	X	+	-	+
29-1	X	-	-	-
3-2B	+	+	-	+
19-2	X	-	-	-
20-2	X	+	+	-
3-3	X	-	-	-
12-3	X	+	-	-
12-4A	X	-	-	-
20-4A	X	-	-	-
3-1a	X	+	+	+

(+) crescimento do isolado testado; (-) ausência de crescimento do isolado testado; (x)

Não-inibição do crescimento do fungo *B. cinerea*.

Identificação das linhagens selecionadas pelo perfil de ácidos graxos da membrana celular.

A identificação das linhagens que apresentaram melhor atividade contra *B. cinerea* foram identificadas taxonomicamente (**TABELA 2**), demonstrando pertencerem ao gênero *Pseudomonas* sp.

TABELA 2. Identificação das linhagens bacterianas associadas às plantas da Antártica, com atividade antagônica a *Botrytis cinerea*.

Linhagens	Nome Científico	Índice de Similaridade
3-6	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.949
44-4	<i>Pseudomonas syringae</i>	0.682
8-B	<i>Pseudomonas syringae</i>	0.841
8-A	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.956

Avaliação do controle biológico “*in vivo*” de *Botrytis cinérea* em morango sob baixa temperatura.

Dentre as quatro linhagens testadas, apenas uma (*Pseudomonas syringae*), 44-4, apresentou forte inibição frente ao fitopatógeno. Vale ressaltar que a inibição foi observada apenas na temperatura de 4°C (**FIGURA 2**). Tal resultado pode ser indicativo de uma bactéria psicrotolerante e com produção de metabólitos secundários a baixas temperaturas, em outro mecanismo de ação, como enzimas capazes de lisar a parede celular de *B. cinerea*. Estes resultados abrem novas fontes de estudo visando o controle biológico deste patógeno em câmaras frigoríficas.



FIGURA 2: Avaliação do efeito de controle de *B. cinerea* por *Pseudomonas syringae* em frutos de morango. À esquerda, controle (IA) e à direita (ISB+PSF).

P. syringae tem sido mencionada como agente de controle biológico de fungos fitopatogênicos.

Bull et al. (1998), por exemplo, mostram que linhagens de *Pseudomonas syringae* produzem siringomicina e que é inibitória a vários fungos e que o composto purificado pode controlar o mofo verde em culturas de limoeiro.

CONCLUSÃO

Bactérias associadas as plantas da Antártica podem apresentar potencial de controle de fungos fitopatogênicos e que os mecanismos de ação necessitam ser avaliados.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Centro Nacional de Pesquisa) pelo apoio com a bolsa de Iniciação Científica PIBIC, e a EMBRAPA - Meio Ambiente pelo suporte e estrutura para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

BULL, C.T., WADSWORTH, M.L., SORENSEN, K.N., TEKEMOTO, J.Y., AUSTIN, R.K., SMILANICK, J.L. SYRINGOMYCIN E produced by biological control agents controls green mold on lemons. **Biological Control**, v. 12, p. 89-95, 1998.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. International collaboration in drug discovery and development from natural sources. **Pure Applied Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 1923-1942, 2005.

DUARTE, R. T. D. Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e *permafrost* polares. 2010. 202 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto Butantan/IPT – Universidade de São Paulo.

KIMATI, H., AMORIM, L., FILHO, B. A., CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia vol. 2**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1997. 706p. ISBN 85-318-0008-0.

RAY, M.K. Cold-stress response of low temperature adapted bacteria. In: SREEDHAR, A.S.; SRINIVAS, U.K. **Stress Response: A Molecular Biology Approach**. India: Research Singpost, 2006. ISBN 81-308-0109-4.

SASSER, M. identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. **Tech Note** 101 MIDI. Newark, D.E., 1990.