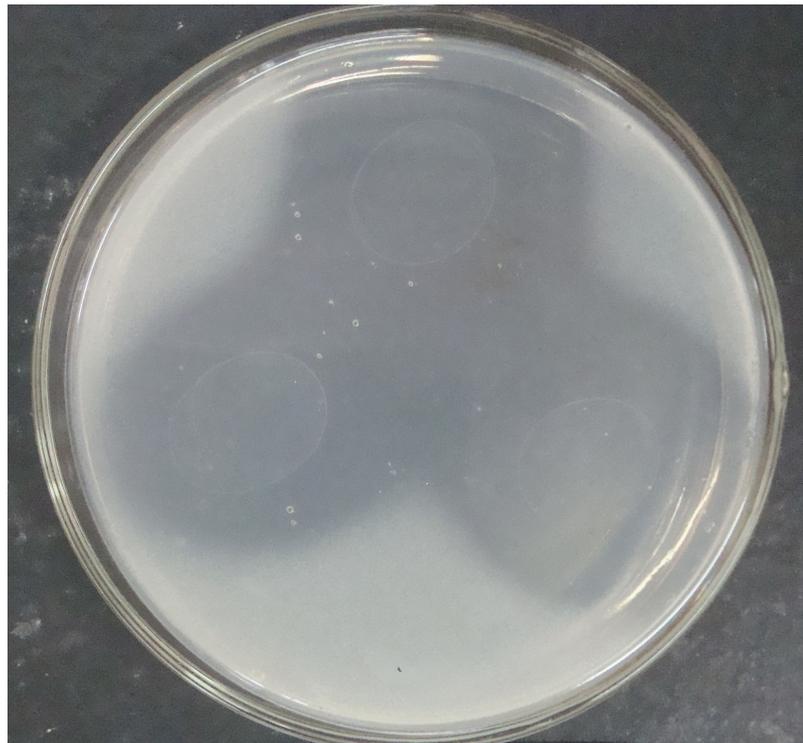


**Indução de substâncias antagônicas
produzidas pela bactéria endofítica
Gluconacetobacter diazotrophicus
por raios ultravioleta**





Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1676-6709

Dezembro/2009

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 57

Indução de substâncias antagônicas produzidas pela bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* por raios ultravioleta

Marcela Motta Drechsel
Márcia Soares Vidal
José Ivo Baldani

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 3441-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Norma Gouvea Rumjanek (Presidente)

José Ivo Baldani

Guilherme Montandon Chaer

Luis Henrique Barros Soares

Bruno José Rodrigues Alves

Ednaldo Araújo

Carmelita do Espírito Santo (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Stefan Schwab e Guilherme Montandon Chaer

Normalização Bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2009): 50 exemplares

D771i Drechsel, Marcela Motta.

Indução de substâncias antagonicas produzidas pela bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* por raios ultravioleta / Marcela Motta Drechsel, Márcia Soares Vidal e José Ivo Baldani. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 18 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento, 57).

ISSN 1676-6709

1. Bactéria endofítica - Antagonismo. 2. Controle biológico. I. Vidal, Márcia Soares. II. Baldani, José Ivo. III. Título. IV. Embrapa Agrobiologia. V Série.

CDD 632.32

Autores

Marcela Motta Drechsel

Doutorando em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. E-mail: marceladrechsel@gmail.com

Márcia Soares Vidal

Bióloga, DSc em Genética, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ. E-mail: marcia@cnpab.embrapa.br

José Ivo Baldani

Engenheiro Agrônomo, PhD em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ. E-mail: ibaldani@cnpab.embrapa.br

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução	9
Material e métodos.....	10
Estirpes, meios e condições de cultivo	10
Teste de antagonismo	11
<i>Indução de atividade antagonística</i>	11
• Adição de clorofórmio	11
• Exposição aos raios ultravioleta	11
<i>Cultivo da estirpe-alvo de antagonismo em sobrecamada</i>	11
Resultados e Discussão	11
Conclusão	14
Referências Bibliográficas	14

Indução de substâncias antagônicas produzidas pela bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* por raios ultravioleta

Marcela Motta Drechsel
Márcia Soares Vidal
José Ivo Baldani

Resumo

Microrganismos endofíticos têm sido utilizados no controle biológico uma vez que podem controlar fitopatógenos por competição de espaço, nutrientes e produção de bacteriocinas. Este trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* o efeito da exposição ao clorofórmio ou à radiação ultravioleta sobre a produção de substâncias antagônicas pela estirpe PAL5^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra a bactéria *Xanthomonas albilineans* (agente causal da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar). A metodologia de antibiose por difusão em dupla camada foi a utilizada para a detecção do antagonismo. *G. diazotrophicus* foi cultivada em meio DYGS líquido e alíquotas desta cultura foram transferidas para o meio sólido DYGS. Após crescimento por 24 horas as bactérias foram submetidas à morte celular, por meio de exposição a luz ultravioleta ou pela adição de clorofórmio e reincubadas por 24 horas. Após a incubação, 1 mL de cultura de *X. albilineans* foi homogeneizado em meio semi-sólido DYGS e colocado como uma segunda camada onde a *G. diazotrophicus* havia sido crescida previamente. As placas foram incubadas por 24 horas após a qual se verificou a formação de halo de inibição. Tanto no tratamento onde ocorreu a adição de clorofórmio quanto no controle (sem exposição a clorofórmio ou raio ultravioleta) não houve a formação do halo. A atividade antagônica só foi observada quando a cultura líquida de *G. diazotrophicus* foi previamente submetida à radiação UV. Os resultados observados sugerem que a produção de substâncias antagônicas em *G. diazotrophicus* é induzida pela luz ultravioleta em meio de cultura líquido.

Palavras-chaves: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Xanthomonas albilineans*, antagonismo, controle biológico.

Abstract

Endophytic microorganisms have been used for biological control since they may control pathogens by competition for space, nutrients and bacteriocin production. This study aimed to evaluate *in vitro* the effect of chloroform exposition or ultraviolet radiation to antagonistic substances produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T strain against *Xanthomonas albilineans* (causal agent of leaf scald in sugarcane). The double layer method was used to evaluate the antagonism. *G. diazotrophicus* was cultivated in liquid DYGS medium and aliquots were transferred to solid DYGS medium. After growth for 24 hours, the bacteria were submitted to cell death by ultraviolet radiation or chloroform addition and reincubated for 24 hours. Thereafter, 1 ml of *X. albilineans* culture was added to semi-solid DYGS medium which was placed as a second layer where *G. diazotrophicus* was previously grown. The inhibition halo was observed 24 hours later. The cells treated with chloroform and the control (without chloroform or UV exposure) did not form halo. The antagonistic activity was only observed when the liquid culture of *G. diazotrophicus* was subjected to UV radiation. These results suggested that production of antagonistic substances by *G. diazotrophicus* is induced by ultraviolet radiation in liquid culture medium.

Key-words: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Xanthomonas albilineans*, antagonism, biological control

Introdução

Bactérias endofíticas são aquelas que colonizam tecidos internos de uma planta não se observando sinais externos de patogenicidade ou qualquer efeito negativo sobre o hospedeiro (HALLMANN et al., 1997). Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles de patógenos, as bactérias endofíticas apresentam grande potencial para o controle biológico (HALLMANN et al., 1997). Este controle pode ser resultante de diversos mecanismos como competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira; produção de compostos antimicrobianos (PLEBAN et al., 1997) e indução de resistência sistêmica (M'PIGA et al., 1997; BENHAMOU et al., 2000; DUIJFF et al., 1998).

Nos últimos 15 anos, uma gama de isolados de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (principalmente espécies do gênero *Herbaspirillum* e a *Gluconacetobacter diazotrophicus*) associadas à cana-de-açúcar tem sido testada quanto ao seu potencial de contribuição na nutrição nitrogenada da cultura em ensaios experimentais (MUTHUKUMARASAMY et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006). Entretanto, apesar da potencialidade da cultura de cana-de-açúcar na geração de divisas para o país, poucos estudos foram realizados para a avaliação dos possíveis efeitos da utilização desses microrganismos endofíticos no controle biológico de suas principais doenças.

Sabe-se que as metodologias *in vitro* que avaliam a potencialidade antagônica de possíveis agentes de biocontrole não substituem os métodos clássicos de inoculação na planta (ROMEIRO, 2007). Entretanto tais metodologias são largamente empregadas por mimetizar eventos que seriam de difícil análise *in vivo*, além da geração de resultados rápidos e de boa reprodutibilidade e de auxiliar no processo de seleção de agentes de biocontrole (ROMEIRO, 2007). Dentre as metodologias empregadas destacam-se a de antibiose por difusão em dupla camada, produção de compostos voláteis e produção de sideróforos (DAVISON, 1988).

A metodologia de antibiose por difusão em dupla camada é a mais utilizada para estudos *in vitro* de controle biológico (KÉKESSY e PIGUET, 1970). Neste método, o microrganismo antagonista é incubado em placas com o seu meio específico. Após o crescimento, as células são mortas pela adição de clorofórmio, para se certificar que a atividade antagônica acontece pela atividade de substâncias

excretadas no meio e não por uma possível competição entre microrganismos. Em etapa posterior, adiciona-se uma cultura líquida do fitopatógeno junto a um meio de cultura fundente específico para o crescimento da bactéria. A verificação da presença do halo de inibição que representa o antagonismo, se dá após 1 a 5 dias de incubação. Muitos pesquisadores utilizam a adição do clorofórmio para a morte celular (WIRAWAN et al., 2007; SMARDA et al., 2007). Outros autores modificaram a metodologia de Kékessy e Piguet (1970) utilizando a exposição a raios ultravioleta tanto para a morte das colônias das células produtoras de antibiose quanto para aumentar a produção de bacteriocinas (KYEREMEH et al., 2000; BEGLEY et al., 2009).

Este trabalho teve por objetivo investigar a indução por exposição a clorofórmio e à radiação ultravioleta sobre a produção de substâncias antagônicas pela bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* à bactéria *Xanthomonas albilineans*, agente causadora da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar.

Material e métodos

Estirpes, meios e condições de cultivo

Para este ensaio utilizou-se a estirpe PAL5^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, obtida da coleção de cultura de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, e a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans* obtida da coleção de bactérias fitopatogênicas do Instituto Biológico do estado de São Paulo.

Uma colônia característica de cada estirpe, obtida de cultivo em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986), foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS, permanecendo em agitação constante de 200 rpm a 30°C. A estirpe de *G. diazotrophicus* foi incubada por 24 horas enquanto que a estirpe de *X. albilineans* foi cultivada por 48 horas. Para o teste de antagonismo, a bactéria *G. diazotrophicus* foi inoculada em meio sólido DYGS em alíquotas de 100 µL, em três pontos equidistantes, e as placas incubadas por 24 horas.

Teste de antagonismo

Indução de atividade antagonística

- **Adição de clorofórmio**

As placas contendo as culturas de *G. diazotrophicus* crescidas em meio sólido foram invertidas e foi adicionado 1 mL de clorofórmio na parte interna da tampa da placa afim de matar as células formadoras das colônias. O clorofórmio residual foi evaporado pela abertura das placas por 30 minutos dentro da capela de fluxo laminar.

- **Exposição aos raios ultravioleta**

As colônias de *G. diazotrophicus* foram expostas por 30 minutos a radiação ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$) que equivale a uma energia de 120 microwatts/cm², com as placas de petri destampadas afim de matar as células formadoras das colônias. Uma variação desta metodologia foi a exposição dos tubos de ensaio, mantidos em posição vertical e sem tampas de vedação, contendo a cultura líquida de PAL5^T, à radiação ultravioleta antes destas serem incubadas em meio sólido para o crescimento das células. Como controles dos testes de antagonismo foram utilizadas culturas não expostas ao clorofórmio e à radiação ultravioleta. Para todos os testes foram utilizadas 3 placas por tratamento com um delineamento inteiramente casualizado.

Cultivo da estirpe-alvo de antagonismo em sobrecamada

Seguiu-se a metodologia de antibiose por difusão em dupla camada descrita por Kékessy e Piguet, (1970) com algumas modificações. Adicionou-se uma sobrecamada contendo 4 mL de meio DYGS fundente (45°C) semi-sólido com 1 mL de suspensão celular de *X. albilineans*. A análise de dados ocorreu após 24 horas de incubação por meio de detecção visual de presença ou ausência da formação de halo de inibição.

Resultados e Discussão

Não foi observado antagonismo da bactéria *G. diazotrophicus*, utilizada como produtora de substâncias antagônicas, contra a bactéria fitopatogênica *X. albilineans*, quando o clorofórmio foi utilizado

para a morte celular (Figura 1A). Conforme esperado, também não foi observada a presença de halo no tratamento controle (ausência de exposição ao clorofórmio) (Figura 1B).

Resultados positivos de antagonismo foram observados por Muñoz-Rojas et al. (2005) ao utilizarem a metodologia de dupla camada com a adição de clorofórmio na avaliação de estirpes de *G. diazotrophicus* contra outras estirpes desta mesma espécie. Não está clara a razão do efeito observado contra outras estirpes da mesma espécie e não contra uma estirpe de outra espécie.

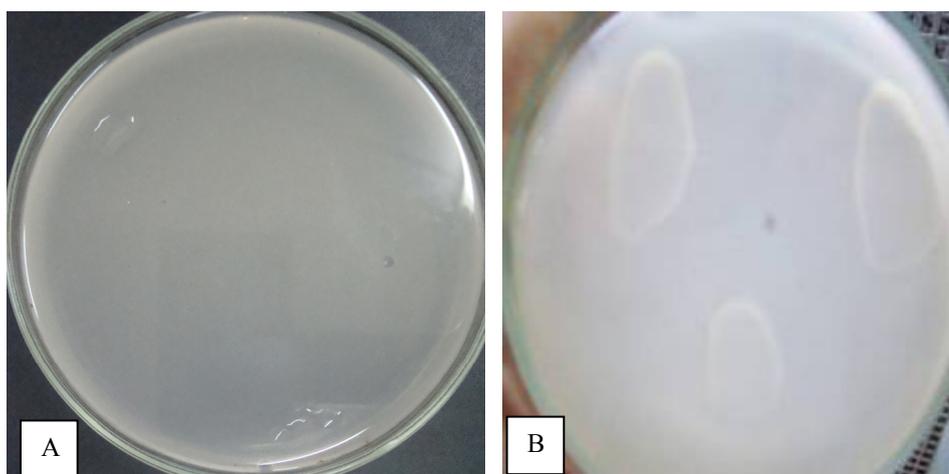


Figura 1: Antagonismo da estirpe PAL5^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans* aplicada em sobrecamada. A: células de PAL5^T mortas pela adição de clorofórmio; B: controle negativo (ausência de clorofórmio).

Também não foi observada atividade antagônica contra *X. albilineans* quando as colônias já incubadas da *G. diazotrophicus* foram tratadas com radiação ultravioleta no meio que recebeu a segunda camada (Figura 2A). Existem diversos estudos de antagonismo entre bactérias que utilizam a exposição à radiação ultravioleta na metodologia da dupla camada (KYEREMEH et al., 2000; BEGLEY et al, 2009). Nesses estudos, as estirpes com o potencial antagônico a serem testados são expostas à radiação ultravioleta no próprio meio que receberá a segunda camada. A finalidade do UV nestes estudos é assegurar a morte das bactérias e conseqüentemente excluir a possibilidade de que o antagonismo seja devido a alguma competição entre as duas bactérias a serem testadas assim como induzir a produção de substâncias antagônicas conforme discutido abaixo.

Entretanto, em nossas avaliações com *G. diazotrophicus* e *X. albilineans* a presença de halo só foi observada quando a *G.*

diazotrophicus foi irradiada com UV durante seu crescimento prévio em meio líquido (Figura 2B). Tal mecanismo de antagonismo foi proposto por Spangler e colaboradores em 1985. Segundo estes autores a produção de agentes antimicrobianos como bacteriocinas em bactérias Gram-negativas, é induzida pela presença de agentes que danificam o DNA ou por fatores ambientais como o aumento da densidade populacional ou falta de nutrientes. Quando essas bactérias são expostas a radiação ultravioleta, bacteriocinas são produzidas em larga escala (JAMES et al., 1996). Segundo esses autores, o fator responsável por esta indução é o “sistema SOS de reparo do DNA”. Quando o sistema SOS é induzido, a bacteriocina se acumula dentro da célula e sua exportação só inicia quando esta se encontra em uma grande concentração no citoplasma bacteriano. Pela ação de uma proteína de transporte, a membrana externa começa a ficar permeável permitindo assim a liberação de proteínas de baixo peso molecular, o que inclui muitos agentes de antagonismo (JAMES et al., 1996).

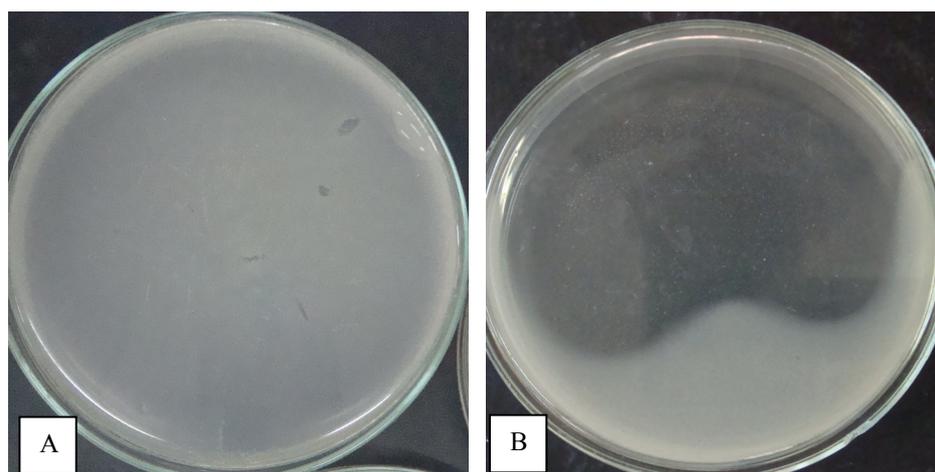


Figura 2: Antagonismo da estirpe PAL5^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra a estirpe ICMP 196 de *Xanthomonas albilineans*. A: exposição das colônias de PAL5^T à radiação ultravioleta após o crescimento da bactéria na placa por 24 horas; B: Exposição da cultura líquida de PAL5^T à radiação ultravioleta por 30 minutos seguido da inoculação em placas contendo o meio de cultivo DYGS. Em ambos os casos, uma sobrecamada de meio de cultivo contendo *X. albilineans* foi inoculada após a incubação por 24 horas.

Os resultados apresentados sugerem que a radiação ultravioleta induziu a produção de compostos antimicrobianos na estirpe PAL5^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus* durante a exposição das células em fase logarítma em meio de cultura líquida. A razão da causa da indução só ocorrer em *G. diazotrophicus* em cultura líquida ainda é desconhecido. É possível que a estrutura da colônia formada em meio sólido sirva como uma espécie de barreira física para a exportação de

agentes antagonistas induzidos ou mesmo que a quantidade de substância liberada seja pequena e insuficiente para a formação de halo. Esta metodologia otimizada para *G. diazotrophicus* servirá como ferramenta para outros estudos de síntese e regulação da expressão de genes envolvidos na produção de bacteriocinas já identificados no genoma da *G. diazotrophicus* e a possível utilização destas substâncias antagônicas no controle de fitobacterioses como, por exemplo, a escaldadura das folhas e raquitismo da soqueira em cana-de-açúcar.

Conclusão

A radiação ultravioleta estimula a produção de substâncias antagônicas pela estirpe PAL5^T da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* em meio líquido contra a bactéria fitopatogênica *X. albilineans*.

Referências Bibliográficas

BEGLEY, M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for lanm proteins, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, v. 75, n. 17, p. 5451–5460, 2009.

BENHAMOU, N.; GAGNÉ, S.; QUÉRÉ, D. L.; DEHBI, L. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Phythium ultimum*. **Phytopathology**, v. 90, p. 45-56, 2000.

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria, **Nature Biotechnology**, London, v. 6, p. 282-286, 1988.

DUIJFF, B. J.; POUHAIR, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* wcs417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 903-910, 1998.

HALLMANN, J.; QUADT-HALMMANN, A.; MAHAFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops, **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

JAMES, R.; KLEANTHOUS, C.; MOORE, G. R. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 1569-1580, 1996

KÉKESSY D. A.; PIGUET. J. D. New method for detecting bacteriocin production. **Applied Microbiology**, Washington-DC, v. 20, 282-283, 1970.

KYEREMEH, A. G.; KIKUMOTO, T.; CHUANG, D.; GUNJI, Y.; TAKAHARA, Y.; EHARA, Y. Biological control of soft rot of chinese cabbage using single and mixed treatments of bacteriocin-producing avirulent mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, **Journal of Genetic Plant Pathology, Tokyo**, v. 66, p. 264-268, 2000.

M'PIGA, P.; BELANGER, R. R.; PAULILTZ, 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. **Physiology Molecular Plant Pathology**, Maryland Height, v. 50, p. 301-320, 1997.

MUÑOZ-ROJAS, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association, **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v.54, p. 57-66, 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. In micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, Maryland Heights, v. 161, p. 238-245, 2006

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 284, p. 23-32, 2006.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of na endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, p. 284-288, 1997.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 12, p. 16, 1986.

ROMEIRO, R. S. Controle biológico de enfermidades de plantas: procedimentos. Viçosa, Ed. UFV, 172 p., 2007.

SMARDA, J.; SMAJS, D.; LHOTOVÁ, H.; DEDICOVA, D. Occurrence of strains producing specific antibacterial inhibitory agents in Five genera of Enterobacteriaceae. **Current Microbiology**, New York, v. 54, p. 113-118, 2007.

SPANGLER, R.; ZHANG, S.; KRUEGER, J.; ZUBAY, G. Colicins synthesis and cell death. **Journal of Bacteriology**, Washington-DC, v. 163, p. 167-173, 1985.

WIRAWAN, R. E.; SWANSON, K. M.; KLEFFMANN, T.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. **Microbiology**, New York, v. 153, p. 1619-1630, 2007.

Embrapa

Agrobiologia

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

