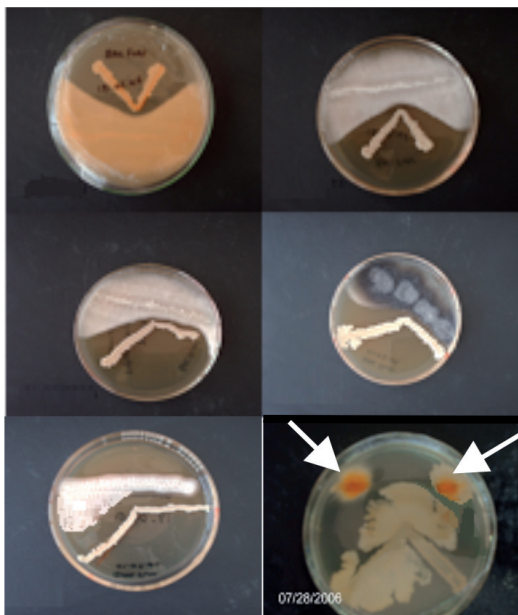


Foto: José Edson Fontes Figueiredo



Avaliação da Atividade Antagonista da Bactéria Endofítica CNPMS-22 sobre Fungos Fitopatogênicos *In Vitro*

José Edson Fontes Figueiredo¹
Marta Aparecida Teixeira²
Wellington Bressan³
Nicésio Filadelfo Jansen Pinto⁴
Carlos Roberto Casela⁵

Microrganismos endofíticos apresentam distribuição ampla e podem ser encontrados virtualmente em todas as espécies de plantas, residindo em tecidos vivos do hospedeiro, tanto no interior de células (JACOBS et al., 1985), quanto em espaços intercelulares (PATRIQUIN; DOBEREINER, 1978) ou nos sistemas vasculares (BELL et al., 1995). Tradicionalmente, microrganismos endofíticos foram definidos como patógenos latentes que, no momento do isolamento, não se apresentavam causando danos substanciais ao hospedeiro e não traziam nenhum benefício para as plantas (THOMAS; GRAHAM, 1952). No entanto, o termo endófito restringe-se aos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, que colonizam o interior de plantas sem causar nenhum dano ao hospedeiro (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990; ZINNIEL et al., 2002; YANG et al., 2005). Em período recente, endófitos são considerados como fonte potencial de novos genes, proteínas e compostos bioquímicos naturais que podem ser usados na medicina, na agricultura

e na indústria (LIMA et al., 2005; GUNATILAKA, 2006; STROBEL, 2006). O organismo inteiro ou seus produtos oferecem oportunidade para inovação e desenvolvimento de novas drogas e de agroquímicos. Isso é particularmente verdadeiro para organismos de ambientes tropicais, ainda muito pouco estudados. O potencial biotecnológico de isolados endofíticos testados para atividade antagonista e produção *in vitro* de antibióticos, drogas anticâncer, antimicóticos, imunossuppressores, sideróforos e hormônio de crescimento de plantas tem despertado o interesse de diferentes setores da economia nos últimos anos (SESSITSCH et al., 2004; GUNATILAKA, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que bactérias endofíticas aceleram a emergência de plântulas, potencializam o crescimento e o desenvolvimento de plantas e promovem o estabelecimento de culturas em ambientes adversos devido à produção de hormônios, participação em processos biogeoquímicos como solubilização de fosfato e

¹Biólogo, Doutor em Bioquímica e Imunologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jeff@cnpms.embrapa.br

²Técnica farmácia, Centro de Formação e Aperfeiçoamento Profissional - CEFAP, martat910@yahoo.com.br

³Eng.-Agrônomo, Doutor em Fitotecnia, Pesquisador aposentado da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁴Eng.-Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Pesquisador aposentado da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

⁵Eng.-Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Pesquisador aposentado da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, caselacarlos@hotmail.com

fixação biológica de nitrogênio e transformação de metano em carbono fixado durante a fotossíntese (BOTTINI et al., 2004; RAGHOEBARSING et al., 2005).

Bactérias endofíticas apresentam atividades antagonistas contra diferentes organismos fitopatogênicos e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole de doenças e pragas de plantas (BENHAMOU et al., 2000; STURZ; NOWAK, 2000; SESSITSCH et al., 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005). Diferentes linhagens de bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* sp. (KLOEPPER et al., 1989) e das espécies *Curtobacterium luteum* e *Pantoea agglomerans* (STURZ et al., 1999) inibem o crescimento de *Erwinia carotovora* (INIGUEZ et al., 2005). *Pseudomonas* isoladas da rizosfera e da endorriza do milho foram efetivas em controlar doenças fúngicas (BERG et al., 2005). *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas veronii* e *Sphingomonas trueperi* isoladas de arroz inibiram o crescimento in vitro de *Achlya klebsiana* e *Pythium spinosum*, que são os principais patógenos causadores de doenças em *seedling* do arroz. Essas bactérias também promoveram o crescimento de plantas (ZINNIEL et al., 2002).

Controle biológico utilizando a bactéria endofítica *Bacillus subtilis* foi capaz de reduzir os níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *Fusarium moniliforme* (BACON et al., 2001). Do mesmo modo, *Bacillus cereus* endofítico isolado de *Sinapis* excreta quitinase e sua aplicação no solo protegeu de forma significativa plântulas de algodão contra doenças causadas por *Rhizoctonia solani* (PLEBAN et al., 1997). Linhagens de *Bacillus subtilis* exibem atividade contra *Cryphonectria parasitica* (WILHELM et al., 1997).

No presente estudo, bactérias endofíticas foram isoladas de folhas coletadas de plantas de milho no campo (variedade não identificada), esterilizadas superficialmente com etanol 70% durante três minutos, lavadas uma vez com água destilada estéril, imersas em solução de cloreto de cálcio a 3% durante cinco minutos e novamente lavadas três vezes com água destilada estéril. As folhas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 5

mm e plaqueadas em meio D2 (KADO; HESKETT, 1970). Colônias bacterianas foram coletadas imediatamente após o surgimento em placa, estriadas pelo menos cinco vezes para assegurar a obtenção de colônias isoladas e cultivadas em meio D2 líquido para extração de proteínas totais e de DNA genômico. Colônias que apresentaram perfil semelhante foram consideradas como réplicas e apenas uma delas passou a ser considerada para sequenciamento de rDNA. Foram identificadas 48 colônias e o sequenciamento de DNA revelou algumas espécies ainda não descritas (dados não publicados de FIGUEIREDO et al.).

Previamente, bactérias endofíticas foram isoladas e identificadas por meio de sequenciamento parcial de genes ribossomais e testadas para atividade antagonista contra fungos causadores de doenças em milho e sorgo (*Acremonium striticum*, *Fusarium verticillioides*, *Exserohilum turcicum* e *Colletotrichum sublineolum*) e também contra 48 morfotipos de fungos isolados de sementes de grãos armazenados da variedade BR106 (dados não publicados de FIGUEIREDO et al.). Os isolados fúngicos foram inoculados em meio BDA e incubados por 5 a 7 dias (*Fusarium verticillioides*, *Exserohilum turcicum*) e 15 dias (*Acremonium striticum* e *Colletotrichum sublineolum*). Alguns dos isolados bacterianos não foram capazes de restringir o crescimento dos fungos testados, enquanto outros apresentaram resultados variáveis. Destacou-se o isolado CNPMS-22, identificado como *Bacillus subtilis* por meio de sequenciamento parcial de rDNA, que foi capaz de controlar o crescimento dos quatro fungos fitopatogênicos (Figura 2) bem como de todos os 48 morfotipos testados (dados não mostrados). Tanto a inoculação conjunta da bactéria CNPMS-22 quanto a sua inoculação em culturas de fungos com até 5 dias de plaqueamento, preveniu o desenvolvimento das quatro espécies de fungos fitopatogênicos testados neste estudo.

Atualmente estão sendo desenvolvidos métodos para inoculação de sementes de milho e sorgo com CNPMS-22 visando a proteção de grãos armazenados e de plântulas. Também serão iniciados testes em casa de vegetação e no campo para utilização de CNPMS-22 em aplicações por aspersão visando prevenir o surgimento de doenças fúngicas nas diferentes fases das culturas do milho e do sorgo.

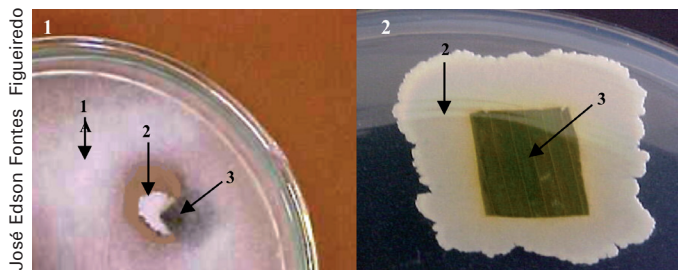


Figura 1. Isolamento da bactéria CNPMS22 de milho. (1) Bactéria inicialmente identificada em placas contendo meio BDA semisólido para isolamento de fungos endofíticos do milho. Os números 1, 2, e 3 indicam, respectivamente, fungo contaminante, bactéria e pedaço de folha de milho. (2) Bactéria endofítica isolada de folha do milho em meio D2 semisólido.

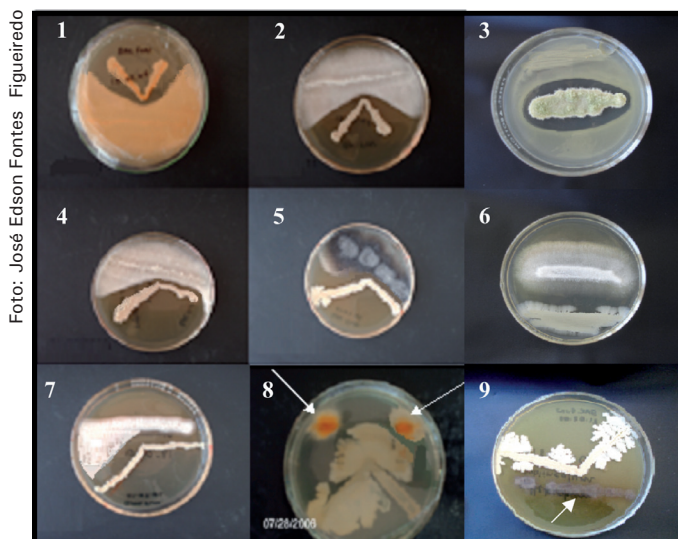


Figura 2. Ensaio in vitro com a bactéria CNPMS22, fungos fitopatogênicos às culturas do milho e do sorgo e morfotipos de fungos de sementes de milho. (1) *Fusarium verticillioides* isolado CNPMS; (2) morfotipo 35; (3) *Fusarium verticillioides* isolado Dourados; (4) *Exserohilum turcicum*; (5) *Acremonium strictum*; (6) morfotipo 32 (7) morfotipo 17; (8) morfotipo 26; (9) *Colletotrichum sublineolum*.

Referências

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 325-332, 2001. Suppl 2.

BELL, C. R.; DICKIE, G. A.; HARVEY, H. L. G.; CHAN, J. W. Y. L. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 46-53, 1995.

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

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiological Ecology**, Haren, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2005.

BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 497-503, 2004.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 69, p. 509-526, 2006.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; CARTER, H. D.; AHMER, B. M.; STONE, J. M.; TRIPLETT, E. D. W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 2, p. 169-178, 2005.

JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar-beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, p. 1262-1265, 1985.

KADO C. I.; HESKETT M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacteria for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 39-43, 1989.

LIMA, A. O.; QUECINE, M. C.; FUNGARO, M. H.; ANDREOTE, F. D.; MACCHERONI JR., W.; ARAUJO, W. L.; SILVA-FILHO, M. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of a beta-1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 68, n. 1, p. 57-65, 2005.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.

PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J. Light-microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 734-742, 1978.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 284-288, 1997.

RAGHOEBARSING, A. A.; SMOLDERS, A. J.; SCHMID, M. C.; RIJPSTRA, W. I.; WOLTERS-ARTS, M.; DERKSEN, J.; JETTEN, M. S.; SCHOUTEN, S.; SINNINGHE, D. J. S.; LAMERS, L. P.; ROELOFS, J. G.; OP DEN CAMP, H. J.; STROUS, M. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. **Nature**, London, v. 436, n. 7054, p. 1153-1156, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 4, p. 239-249, 2004.

STROBEL, G. A. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 240-244, 2006.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; ARSENAULT, W. J.; BUCHANAN, N. A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, London, v. 48, p. 360-369, 1999.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 183-190, 2000.

THOMAS, W. D.; GRAHAM, R. W. Bacteria in apparently healthy pinto beans. **Phytopathology**, St. Paul, v. 42, p. 214, 1952.

WILHELM, E.; ARTHOFER, W.; SCHAFLEITNER, R. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). In: CASSELLS, A. C. (Ed.). **Pathogen and microbial contamination management in micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 331-337.

YANG, R. X.; SUN, G. Y.; ZHANG, R.; CHEN, L. J. 16S rDNA RFLP analysis of endophytic bacteria from *Brassica napus*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, Beijing, v. 45, n. 4, p. 606-609, 2005.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

Comunicado Técnico, 186

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
 Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
 Fone: (31) 3027 1100
 Fax: (31) 3027 1188
 E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br
 1ª edição
 1ª impressão (2010): on line

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.

Supervisão editorial: Adriana Noce.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.

Expediente

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.