

Maio e Junho de 2001

VOL. XLVIII | Nº 277

Viçosa – Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO MASSAL DE
ACTINOMICETOS ANTAGÔNICOS A
*Agrobacterium tumefaciens*¹**

Harllen Sandro A. Silva²
Reginaldo da Silva Romeiro²

RESUMO

De amostras de solo, coletadas em diferentes locais, procedeu-se ao isolamento, em meio extrato de solo-ágar, de 321 culturas de actinomicetos. Todos foram individualmente testados para verificar a atividade de antibiose "in vitro" contra *Agrobacterium tumefaciens* e a eficiência em proteger folhas destacadas de *Kalanchoe tubiflora* contra o patógeno. Combinando-se os resultados destes dois testes, foi possível selecionar 33 actinomicetos como potenciais antagonistas. A repetição dos testes "in vitro" e "in vivo" permitiu estreitar o número de isolamentos de antagonistas promissores para 14, e esses estão sendo testados, em casa de vegetação, para o controle biológico da galha bacteriana da roseira (*A. tumefaciens*).

Palavras-chaves: controle biológico, seleção de actinomicetos, *Kalanchoe tubiflora*

¹ Parte da tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, pelo primeiro autor, como um dos requisitos para a obtenção do grau de "Magister Scientiae" em Fitopatologia. Aceito para publicação em 07.12.2000.

² Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG.

ABSTRACT

ISOLATION AND SELECTION OF ANTAGONIC ACTINOMYCETES TO *Agrobacterium tumefaciens*

A population of 321 actinomycete isolates was obtained from soil samples taken from different places, by using soil extract-agar medium for isolation. Every isolate was tested for its ability to inhibit *Agrobacterium tumefaciens* growth "in vitro" and for their efficiency to protect detached leaves of *Kalanchoe tubiflora* against the pathogen. Based on these trials, 33 actinomycete isolates were pre-selected as potentials antagonists. The repetition of both tests allowed to narrow down to 14 the number of selected isolates, that are being tested for the experimental biological control of rose crown gall (*A. tumefaciens*) under greenhouse conditions.

Key words: biological control, actinomycete selection, *Kalanchoe tubiflora*.

INTRODUÇÃO

O controle biológico de *A. tumefaciens* pelo uso do isolamento K-84 de *A. radiobacter* tem sido usado em escala comercial há mais de 20 anos (4, 7, 22). A fundamentação desse controle recai sobre a bacteriocina denominada Agrocina 84, que é produzida pela bactéria antagonista, que inibe o crescimento de *A. tumefaciens* (16).

Recentemente têm surgido relatos da falha deste tipo de controle em alguns países. Os estudos revelaram que dois fatores estavam contribuindo para tal fato: 1) alguns isolados de *A. tumefaciens*, estranhamente, mostraram-se insensíveis à Agrocina 84; e 2) estaria havendo recombinação entre o antagonista e o patógeno, pela proximidade taxonômica, gerando indivíduos com capacidade de produzir a agrocina, ser insensíveis a esta e ainda ser tumorogênicos (1, 7). Assim, é mister encontrar alternativas para o controle biológico desta bactéria.

Actinomicetos são microrganismos habitantes naturais do solo e muito promissores como potenciais antagonistas a fitopatógenos, por sua conhecida capacidade de produção de substâncias antimicrobianas, principalmente antibióticos, e grande adaptabilidade aos mais diferentes tipos de solo e condições de ambiente (21). A literatura é farta em se tratando de trabalhos de controle de fungos e bactérias por actinomicetos.

Este trabalho teve como objetivo isolar actinomicetos de solos de diferentes locais, montando-se uma pequena coleção, e testá-los quanto ao antagonismo a *A. tumefaciens*, selecionando os mais promissores.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento dos actinomicetos

Amostras de solo de diferentes locais sofreram um pré-tratamento térmico de 70 °C/72 horas (23), para inativar a maioria dos microrganismos não-actinomicetos. A seguir, 10 g de solo foram agitados em 100 ml de solução salina (0,85% NaCl), por 1 hora, e a partir da suspensão obtida fez-se uma série de diluições (1:10). De cada diluição, 100 µl foram semeados em placa de Petri, contendo meio de cultura extrato de solo-ágar (15), e espalhados com o auxílio de alça de Drigalsky. A composição do referido meio é: glicose (1 g), K₂HPO₄ (0,5 g), KNO₃ (0,1 g) e extrato 100 ml, para 900 ml de água destilada.

Para obtenção do extrato, adiciona-se, a um recipiente com 300 g de solo comum, um volume de água de torneira, de modo a cobrir todo o solo e ter uma lâmina de água de 2 ou 3 cm. O conjunto é levado ao aquecimento por 8 minutos, quando atinge a pré-fervura. Decorrido este intervalo de tempo, espera-se a decantação das partículas sólidas e recolhe-se o extrato.

As placas foram, então, incubadas a 30 °C, por até 14 dias. As colônias que apresentavam características morfológicas, de crescimento e de cor típicas de colônias de actinomicetos, surgidas neste intervalo de tempo, foram então repicadas para o mesmo meio de cultura em tubos de ensaio. Ao todo foram isolados 321 actinomicetos.

Bioensaio "in vitro"

Para detecção de atividade de antibiose dos actinomicetos contra *A. tumefaciens*, foi montado um bioensaio "in vitro" pelo método da sobrecamada, adaptado de Stonier (20).

Em placas de Petri de 9 mm de diâmetro, contendo meio sólido de extrato de solo, foram depositadas, equidistantemente, gotas de 5 µl de suspensão de propágulos do potencial antagonista em teste (6 actinomicetos por placa), seguindo-se incubação a 30 °C/72 horas. Decorrido este tempo, as colônias foram mortas por exposição à luz UV (254 nm), por 15 minutos. Uma camada de meio MG (6) semi-sólido fundente (48 °C), ao qual células de *A. tumefaciens* foram incorporadas, foi vertida de modo a formar uma sobrecamada de 1 mm de espessura. As placas foram vedadas com filme plástico ROLOPAC® e incubadas a 28 °C, tendo inspeções diárias sido feitas para detecção de halos de inibição.

Bioensaio com folhas de Kalanchoe tubiflora

A potencialidade de cada um dos actinomicetos como agente de biocontrole foi investigada pelo uso de um bioensaio com folhas destacadas de *Kalanchoe tubiflora* (2, 12, 13, 17, 19).

Para cada actinomiceto, quatro folhas destacadas de *K. tubiflora* tiveram suas bases imersas, por 30 minutos, em suspensão de propágulos, sendo em seguida transferidas para tubos de ensaio que continham vermiculita previamente infestada com suspensão de células ($OD_{540} = 0,2$) de *A. tumefaciens*.

As folhas de *K. tubiflora* imersas em salina estéril e, em seguida, postas na vermiculita infestada foram as testemunhas positivas. Já as folhas que passaram pelo mesmo tratamento e foram postas em vermiculita não-infestada serviram como controles negativos. Os tubos permaneceram sem vedação, em ambiente de laboratório, e após 16 dias, por inspeção visual, avaliaram-se as bases das folhas para detectar a presença e, ou, ausência de tumores.

Seleção

A seleção foi realizada em duas fases, com base nos resultados obtidos nos dois testes feitos e descritos anteriormente. Actinomicetos que evidenciaram atividade de antibiose “in vitro” contra *A. tumefaciens* e, ou, proporcionaram 100% de controle no teste com folhas de *K. tubiflora*, ou seja, as quatro folhas não apresentavam galhas ao fim dos 16 dias, foram os critérios usados para seleção de indivíduos tidos como bons antagonistas.

Assim, uma primeira triagem foi feita e reduziu-se o número de actinomicetos, tendo os antagonistas selecionados se enquadrado nos pré-requisitos citados.

Na segunda fase, os dois testes foram repetidos com os actinomicetos selecionados no primeiro “screening”, porém com duas repetições no tempo no bioensaio “in vitro” e 11 repetições no espaço (11 folhas) no bioensaio com folhas de *K. tubiflora*, de maneira que esse segundo “screening” fosse mais rigoroso.

O mesmo critério para seleção dos melhores antagonistas foi usado nesta etapa, limitando ainda mais o número de actinomicetos selecionados e tidos como os mais promissores para o uso no controle biológico de *A. tumefaciens*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro "screening", o número de actinomicetos foi limitado a 33, tidos como bons antagonistas para o controle da *A. tumefaciens*. Foram eles os actinomicetos de números 002, 022, 063, 114, 125, 154, 217, 223, 377, 526, 528, 533, 539, 540, 545, 555, 560, 571, 584, 606, 618, 624, 638, 665, 677, 685, 699, 860, 861, 905, 934, 941 e 944.

Dos 33 actinomicetos destacados na primeira fase e submetidos a novo "screening", utilizando-se o mesmo critério de seleção, 14 repetiram o desempenho, sendo então selecionados como antagonistas mais promissores para o controle biológico de *A. tumefaciens*. Foram eles os de números 526, 528, 539, 545, 555, 606, 665, 699, 860, 861, 905, 934, 941 e 944. Permanecem obscuras as razões pelas quais, numa segunda triagem, apenas cinco actinomicetos mostraram-se com atividade "in vitro" contra a bactéria.

O meio extrato de solo-ágar foi bastante seletivo para o isolamento de actinomicetos, com alta supressividade de fungos e bactérias, mesmo quando se omitiam componentes geradores de seletividade, como fenol e mistura de antibióticos (9, 23). Foi possível isolar actinomicetos formadores de colônias de diferentes aspectos, uma evidente indicação de diversidade dos isolamentos obtidos, em face da multiplicidade de cores e aspectos de colônias surgidas nas placas.

Todavia, uma identificação mais rigorosa, com métodos bioquímicos ou por análise de ácidos graxos, faz-se necessária. Muitas colônias de actinomicetos apresentaram aspecto bem semelhante, do ponto de vista de morfologia e coloração. No caso de tais actinomicetos serem usados em trabalhos mais complexos, essa identificação torna-se indispensável, para minir izar o erro de se estarem utilizando, por exemplo, dois indivíduos iguais como distintos. A procura por potenciais antagonistas em ecossistemas onde o patógeno existe em seu habitat natural configura uma estratégia lógica de ação, já postulada anteriormente por Napoleão (11). Por essa razão, embora se tenha procurado por actinomicetos nas mais diversas fontes (solo de cultivo de cebola (*Allium cepa*), solo das proximidades de suinocultura, avicultura e estábulo), a maioria dos isolamentos com os quais se trabalhou adveio de solo de cultivo de roseira, de rizosfera e de rizoplano de roseiras sadias e exibindo tumores, a partir de amostras coletadas em propriedades situadas na microrregião de Barbacena, MG, onde há cultivos comerciais de roseira nos quais a galha em coroa ocorre endemicamente (18). Ainda que testes de antibiose "in vitro" tenham sido conduzidos e seus resultados tenham sido considerados como um dos fatores a serem examinados para a tomada de decisão sobre quais actinomicetos seriam selecionados de forma definitiva para continuação dos testes, não se pode assumir ou postular que

a substância ou substâncias antibacterianas inibitórias do crescimento do patógeno sejam, isoladamente, importantes mecanismos de antagonismo (5). Tanto assim que Napoleão et al. (14) demonstraram a inadequação de testes "in vitro", empregados isoladamente, para a seleção de potenciais antagonistas contra *A. tumefaciens*.

Conseqüentemente, a seleção final dos antagonistas mais promissores foi feita após combinar resultados dos testes de antibiose "in vitro" e os resultados do bioensaio em que foram utilizadas folhas destacadas de *K. tubiflora* como planta-teste (12, 19). Embora ainda se revista de artificialismo, se comparado com os testes de campo, por exemplo, no bioensaio com *K. tubiflora* mais mecanismos de antagonismo são testados, como competição por nutrientes, competição por nichos, hiperparasitismo, dentre outros (3).

No teste de antibiose "in vitro" ficou claro que alguns dos antagonistas produziram substâncias não-voláteis, solúveis em água, que se difundiam no gel de ágar, inibindo o crescimento do patógeno, o que foi facilmente visualizado pelos halos de inibição nítidos e mensuráveis. Essa atividade era esperada em face da reconhecida habilidade de actinomicetos em produzir substâncias com propriedades microbianas (8, 10).

Ainda é muito cedo para afirmar que nas folhas de *K. tubiflora* houve indução de resistência sistêmica, visto que até o momento pouco se sabe sobre o desencadeamento deste processo em plantas inteiras e, menos ainda, em partes destas.

A seleção dos actinomicetos, utilizando o teste "in vitro" complementado com o bioensaio com folhas de *K. tubiflora*, atendeu bem aos objetivos do trabalho e à proposta inicial de selecionar os actinomicetos com melhor desempenho no controle da *A. tumefaciens*. Os resultados confirmam tal afirmação, pois de 321 actinomicetos foram obtidos, primeiro, 33 e, posteriormente, 14 antagonistas, com relativa segurança nos dados obtidos, pela boa representatividade verificada nos ensaios com número adequado de repetições.

REFERÊNCIAS

1. BENEDDRA, T.; PICARD, C.; PETTI, A. & NESME, X. Correlation between susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivars. *Phytopathology*, 86: 225-31, 1996.
2. BERIAM, L.O.S.; MALAVOLTA JR., V.A. & ROMEIRO, R.S. Metodologia simples para isolamento indireto de *Agrobacterium tumefaciens*. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 282, 1995.
3. BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: Bettiol, W. (ed.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Brasília, EMBRAPA, 1991. 388p
4. DONNER, S.C.; JONES, D.A.; McCLURE, N.C.; ROSEWARNE, G.M.; TATE, M.E.; KERR, A.; FAJARDO, N.N. & CLARE, B.G. Agrocin 434, a new plasmid encoded agrocin from the biocontrol *Agrobacterium* strains K84 and K1026, which inhibits biovar 2 agrobacteria. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42: 185-94, 1993.

5. KANZAKI, H.; ICHIOKA, T.; KOBAYASHI, A. & KAWAZU, K. Inhibitory effect of curromycins and their esters on plant transformation. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 60: 1535-7, 1996.
6. KEANE, P.J.; KERR, A. & NEW, P.B. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Australian Journal of Biological Science*, 23: 585-95, 1970.
7. KERR, A. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Disease*, 64: 25-30, 1980.
8. KORN-WENDISCH, F. & KÜTZNER, H.J. The family streptomycetaceae. In: Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. & Schlegel, K.H. (eds.). *The prokaryotes*. New York, Springer Verlag, 1992. 1027p.
9. LAWRENCE, C.H. A method of isolation of Actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. *Canadian Journal of Botany*, 34: 44-7, 1956.
10. LOCCI, R. Streptomycetes and related genera. In: Williams, S.T.; Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (eds.) *Bergey's manual of systematics bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. p. 2451-508.
11. NAPOLEÃO, R.L. Avaliação de antagonistas a *Agrobacterium tumefaciens* isolados de rizosfera, rizoplano e tumores de roseiras infectadas. Viçosa, UFV, 1996. 51p. (Tese de Mestrado).
12. NAPOLEÃO, R.L.; ROMEIRO, R.S.; BERIAM, L.O.S. & BARBOSA, J.G. A bioassay for rapid screening of bacteria antagonistic to *Agrobacterium tumefaciens*. *Fitopatologia Brasileira*, 23: 27-9, 1998.
13. NAPOLEÃO, R.L. & ROMEIRO, R.S. Controle biológico de *Agrobacterium tumefaciens*. *Fitopatologia Brasileira*, 21: 343, 1996.
14. NAPOLEÃO, R.L.; ROMEIRO, R.S.; OLIVEIRA, J.R. & ERTHAL JR., M. Método rápido e eficiente "in vivo" para testagem de potenciais procariotas antagonistas a *Agrobacterium tumefaciens*. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 376, 1995.
15. PRAMER, D. & SCHMIDT, E.L. *Experimental soil microbiology*. Minnesota, Burgess Publishing Company, 1964. 107p.
16. ROMEIRO, R.S. *Bactérias fitopatogênicas*. Viçosa, Imprensa Universitária, 1995. 283p.
17. ROMEIRO, R.S.; NAPOLEÃO, R.L.; BARBOSA, J.G. & OLIVEIRA, J.R. Busca por antagonistas a *Agrobacterium tumefaciens* em rizosfera e rizoplano de plantas hospedeiras sadias e infectadas. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 372, 1995.
18. ROMEIRO, R.S.; BARBOSA, J.G.; OLIVEIRA, J.R. & NAPOLEÃO, R.L. Galha da roseira (*Agrobacterium tumefaciens*) na microrregião de Barbacena (Minas Gerais, Brasil) e suas implicações fitopatológicas e econômicas. *Fitopatologia Brasileira*, 19: 320, 1994.
19. SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; BERIAM, L.O.S.; RIBEIRO, R.P.; BARBOSA, J.G.; MOURA, A.B.; OLIVEIRA, J.R. & NAPOLEÃO, R.L. Um modelo biológico para triagem massal de actinomicetos como potenciais antagonistas a *A. tumefaciens*. *Fitopatologia Brasileira*, 21: 340, 1996.
20. STONIER, T. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology*, 79: 889-98, 1960.
21. SYKES, G. & SKYNNER, F. A. *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. London, Academic Press, 1973. 339p.
22. VARENNES, A. A interação entre a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* e as plantas. *Revista de Ciências Agrárias*, 14 (4): 9-33, 1991.
23. WILLIAMS, S.T. & DAVIES, F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *Journal Genetics Microbiology*, 38: 251-61, 1965.