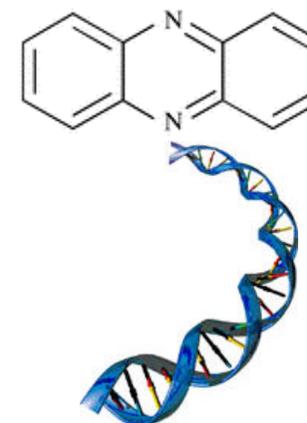


## A Importância dos Antibióticos Produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes na Supressão de Doenças de Plantas



Fontes: [www.nist.gov/public\\_affairs/colloquia/dna.jpg](http://www.nist.gov/public_affairs/colloquia/dna.jpg);  
[journals.iucr.org/.../os1149/os1149scheme1.gif](http://journals.iucr.org/.../os1149/os1149scheme1.gif)

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária***

**Conselho de Administração**

*Luis Carlos Guedes Pinto*  
Presidente

*Silvio Crestana*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*

*Ernesto Paterniani*  
*Hélio Tollini*

Membros

**Diretoria Executiva**

*Silvio Crestana*  
Diretor Presidente

*José Geraldo Eugênio de França*  
*Kepler Euclides Filho*

*Tatiana Deane de Abreu Sá*  
Diretores Executivos

**Embrapa Agrobiologia**

*José Ivo Baldani*  
Chefe Geral

*Eduardo Francia Carneiro Campello*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Rosângela Stralio*  
Chefe Adjunto Administrativo



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

ISSN 1517-8498

Maio/2006

## Documentos 211

A Importância dos Antibióticos Produzidos  
por *Pseudomonas* fluorescentes na  
Supressão de Doenças de Plantas

Glória Regina Botelho  
Gustavo Ribeiro Xavier  
Maria Cristina Prata Neves  
Norma Gouvea Rumjanek

Seropédica – RJ  
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

### Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Verônica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Elen de Lima Aguiar Menezes e Vera Lúcia Divan Baldani

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2006): 50 exemplares

B748i Botelho, Gloria Regina

A importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes na supressão de doenças de plantas / Gustavo Ribeiro Xavier, Maria Cristina Prata Neves, Norma Gouvea Rumjanek. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 31 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 211).

ISSN 1517-8498

1. Antibiótico. 2. Doença de planta. I. Xavier, G. R.; colab. II. Neves, M. C. P., colab. III. Rumjanek, N. G., colab. IV. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). V. Título. VI. Série.

CDD 615.329

© Embrapa 2006

VOISARD, C.; BULL, C. T.; KEEL, C.; LAVILLE, J.; MAURHOFER, M.; SCHNIDER, U.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: current concepts and experimental approaches. In: O'GARA, F.; DOWLING, D. N.; BOESTEN, B. **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs**. Weinheim: VCH, 1994. p. 67-89.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **EMBO Journal**, Oxford, v. 8, p. 358-361, 1989.

WELLER, D. M. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 379-417, 1988.

WELLER, D. M.; COOK, R. J. Suppression of take-all of wheat by seed-treatment with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p. 463-469, 1983.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Use of rhizobacteria for biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 4, p. 306-311, 1993.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms in to the rhizosphere. In: O'GARA, F.; DOWLING, D. N.; BOESTEN, B. **Molecular Ecology of Rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs**. Weinheim: VCH, 1994. p. 1-17.

WOOD, D. W.; PIERSON III, L. S. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. **Gene**, Amsterdam, v. 168, p. 49-53, 1996.

ZHANG, Z.; PIERSON III, L. S. A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4305-4315, 2001.

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in Biological Control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 8, p. 3499-3508, 1988.

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; BONSALL, R. F.; PIERSON III, L. S. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. **Applief and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 908-912, 1990.

THRANE, C.; OLSSON, S.; NIELSEN, T. H.; SØRENSEN, J. Vital fluorescent strains for detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solanii* challenged with viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens* DR54. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 11-23, 1999.

TURNER, J. M.; MESSENGER, A. J. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. **Advances in Microbial Physiology**, San Diego, v. 27, p. 211-275, 1986.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizobacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN PEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 728-734, 1991.

VAN WEES, S. C. M.; LUIJENDIJK, M.; SMOORENBURG, I.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 41, p. 537-549, 1999.

## Autores

### **Glória Regina Botelho**

Eng<sup>a</sup> Agrônoma, Dr. Bolsista da FAPERJ, Fixação de Doutor.  
Embrapa Agrobiologia  
BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica, RJ  
e-mail: gloria@cnpab.embrapa.br

### **Gustavo Ribeiro Xavier**

Eng. Agrônomo, Dr. em Ciência do Solo, Pesquisador da  
Embrapa Agrobiologia.  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: gustavo@cnpab.embrapa.br

### **Maria Cristina Prata Neves**

PhD em Agricultura e Horticultura pela Universidade de  
Reading, Inglaterra, membro da Sociedade Internacional de  
Pesquisa em Agricultura Orgânica (ISO FAR).  
Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, bolsista I do CNPq  
Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505  
23851-970 – Seropédica/RJ  
e-mail mcpneves@cnpab.embrapa.br

### **Norma Gouvêa Rumjanek**

Farmacêutica, PhD em Química Farmacêutica, Pesquisadora  
da Embrapa Agrobiologia.  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: norma@cnpab.embrapa.br

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SMAIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Oxford, v. 20, p. 1-11, 2001

RAMETTE, A.; MÖENNE-LOCCOZ, Y.; DÉFAGO, G. Prevalence fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 44, p. 35-43, 2003.

RAYMOND, R. N.; MULLER, G.; MATZANKE, F. Complexation of iron by siderophores. A review of their solution and structural chemistry and biological function. **Topics in Current Chemistry**, New York, v. 123, p. 49-102, 1984.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, p. 229-236, 2001.

SCHER, F. M.; BAKER, B. Effects of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, p. 1567-1573, 1982.

STANGHELLINI, M. E.; MILLER, R. M. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, p. 4-12, 1997.

STUTZ, E.; DÉFAGO, G.; KERN, H. Naturally occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, p. 181-185, 1986

THOMASHOW, L. S. Biological control of plant root pathogens. **Current Opinion In Biotechnology**, London, v. 7, p. 343-347, 1996.

THOMASHOW, L. S.; MAVRODI, D. V. The genetics and regulation of antibiotic production by PGPR. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S. **Plant growth-promoting rhizobacteria – Present status and future prospects**. Paris: OECD/OCDE, 1997. p. 108-114.

PETERS, R. D.; STURZ, A.V.; CARTER, M. R.; SANDERSON, J. B. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 72, p. 181–192, 2003.

PICARD, C.; DI CELLO, F.; VENTURA, M.; FANI, R.; GUCKERT, A. Frequency and biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from maize rhizosphere at different stages of plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 948-955, 2000.

PIERSON III, L. S.; THOMASHOW, L. S. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 5, n. 4, p. 330-339, 1992.

PIERSON III, L. S.; GAFFNEY, T.; LAM, S.; GONG, F. Molecular analysis of gene encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 134, p. 299-307, 1995.

PIERSON, L. S.; WOOD, D. W.; PIERSON, E. A. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 207-225, 1998.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 881-887, 1997.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M. Exploiting genotypic diversity of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2545- 2554, 2001.

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 537-547, 2002.

## Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

A agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada apoia-se em práticas conservacionistas de preparo do solo, rotações de culturas e consórcios, no uso da adubação verde e de controle biológico de pragas, bem como no emprego eficiente dos recursos naturais. Infere-se daí que os processos biológicos que ocorrem no sistema solo/planta, efetivados por microrganismos e pequenos invertebrados, constituem a base sobre a qual a agricultura agroecológica se sustenta.

O documento 211/2006 aborda os aspectos relacionados a importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes na supressão de doenças de plantas. Este grupo de bactérias além de promoverem o crescimento das plantas atuam com antagonistas na supressão de doenças tanto do solo como da parte aérea. O documento discute em detalhes o uso de *Pseudomonas* spp como agentes de controle biológico e os mecanismos de supressão às doenças além de abordar com riqueza de detalhes a questão da antibiose e da supressão onde os compostos produzidos assim os genes envolvidos na regulação da sua produção são apresentados. Por fim, discute a questão do manejo agrícola e o controle biológicos de doenças tendo como cenário o Sistema Integrado de produção Agroecológica (SIPA) onde as práticas agroecológicas como a agricultura orgânica tem sido usada como alternativa à convencional.

José Ivo Baldani  
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

# SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. <i>Pseudomonas</i> spp. como agentes do controle biológico	8
3. Mecanismos de supressão às doenças.....	8
4. Antibiose e supressividade .....	11
5. A planta e o efeito na produção de antibióticos .....	18
6. Manejo agrícola e o controle biológico de doenças.....	19
7. Conclusão .....	20
8. Referências Bibliográficas .....	21

MOLINA, L.; CONSTANTINESCU, C.; REIMMAN, C.; DUFFY, B.; DÉFAGO, G. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: preventive and curative biological control mechanism. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 71-81, 2003.

MORELLO, J. E.; PIERSON, E. A.; PIERSON, L. S. Negative cross-communication among wheat rhizosphere bacteria: effect on antibiotic production by biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3103-3109, 2004.

NIELSEN, T. H.; THRANE, C.; CHRISTOPHERSEN, C.; ANTHONI, U.; SØRENSEN, D. Structure, production characteristic and fungal antagonism of tensin – a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* 96.578. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 992-1001, 2000.

NIELSEN, T. H.; SØRENSEN, D.; TOBIASEN, C.; ANDERSEN, J. B.; CHRISTOPHERSEN, C.; GIVSKOV, M.; SØRENSEN, J. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* spp. from sugar beet rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3416-3423, 2002.

O'SULLIVAN, D.; O'GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiology Review**, v. 56, n. 4, p. 662-674, 1992.

PAULITZ, T. C. Effect of *Pseudomonas putida* on stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatile of pea and soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 1282-1287, 1991.

PESCI, E. C.; PEARSON, J. P.; SEED, P. C.; IGLEWSKI, B. H. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 3127-3132, 1997.

LIM, H. S.; KIM, S.; KIM, D. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and fungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 510-516, 1991.

LOH, J.; PIERSON, E. A.; PIERSON III, L. S.; STACEY, G.; CHATTERJEE, A. Quorum sensing plant-associated bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 285-290, 2002.

LOPER, J. E.; BUYER, J. S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 4, p. 5-13, 1991.

LOPER, J. E.; NOWAK-THOMPSON, B.; WHISTLER, C. A.; HAGEN, M. J.; CORBELL, N. A.; HENKELS, M. D.; STOCKWELL, V. O. Biological control mediated by antifungal metabolite production and resource competition: an overview. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S. **Plant-growth-promoting rhizobacteria – Present status and future prospects**. Paris: OECD/OCDE, 1997. p. 73-79.

MAVRODI, D. V.; KSENZENKO, V. N.; BONSALL, R. F.; COOK, R. J.; BORONIN, A. M.; THOMASHOW, L. S. A seven –gene locus for synthesis of phenazine –1- carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Journal of Bacteriology**, London, v. 180, n. 9, p. 2541-2548, 1998.

MAVRODI, D.; BONSALL, R. F.; DELANEY, S. M.; SOULE, M. J.; PHILLIPS, G.; THOMASHOW, L. S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, London, v. 183, n. 21, p. 6454-6465, 2001.

MAZZOLA, M.; COOK, J.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; PIERSON III, L. S. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habits. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2616-2624, 1992.

## A importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes na supressão de doenças de plantas

---

Glória Regina Botelho

Gustavo Ribeiro Xavier

Maria Cristina Prata Neves

Norma Gouvea Rumjanek

### 1. Introdução

---

Durante toda a história da agricultura, a humanidade têm lutado para reduzir os efeitos adversos das fitomoléstias nas lavouras. Desde os primórdios, os primeiros agricultores compreenderam os benefícios de práticas culturais, como rotação de cultura e uso de matéria orgânica, para aumentar a produtividade. Sabe-se que muitos destes efeitos são consequência da indução nos processos microbiológicos que diminuem a incidência de plantas doentes. Atualmente, sistemas de agricultura tradicional têm servido de base para controlar muitas doenças oriundas do solo. Um exemplo, são os solos supressivos, os quais serão discutidos mais adiante, nos quais fitopatógenos podem ser introduzidos sem causar nível de dano esperado às plantas cultivadas.

As raízes influenciam as características químicas e físicas do solo e produzem um habitat especializado que estimula a comunidade microbiana. O efeito da rizosfera sob os microorganismos é mais pronunciado nas bactérias (ALEXANDER, 1977) e as bactérias associadas às plantas são denominadas rizobactérias. As rizobactérias são classificadas quanto ao efeito no desenvolvimento na planta. Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (“Plant Growth Promoting Rhizobacteria”- **PGPR**) são aquelas que têm habilidade de promover o crescimento de plantas através da inoculação de sementes ou das partes subterrâneas (KLOEPPER et al., 1980). Dentre as várias espécies bacterianas, *Pseudomonas* spp. do grupo das fluorescentes são as mais abundantes. A promoção do crescimento pode ser feita direta ou indiretamente

(HAAS & DÉFAGO, 2005). Vários metabólitos secundários produzidos por PGPR podem induzir o crescimento de vegetais, indiretamente, por inibição do desenvolvimento de fitopatógenos (THOMASHOW, 1996). O uso de um ou mais organismos, para a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, é denominado Controle Biológico de Doença de Plantas (BETTIOL, 1991). Conseqüentemente, PGPR que produzem antibióticos, podem agir como eficientes agentes do controle biológico.

## **2. *Pseudomonas* spp. como agentes do controle biológico**

Vários gêneros bacterianos de Gram negativas e positivas podem suprimir doenças (COMPANT et al., 2005), porém as *Pseudomonas* fluorescentes são um dos mais efetivos antagonistas selecionados para supressão de doenças, tanto aquelas de solo quanto as de parte aérea (LOPER et al., 1997; THOMASHOW & WELLER, 1988). O potencial de certas estirpes de *Pseudomonas* spp. para supressão de doenças de plantas têm sido demonstrado em diversas partes do mundo (HAAS & DÉFAGO, 2005; LOPER et al., 1997, THOMASHOW, 1996, LEMANCEAU et al., 1995). Geralmente, estirpes isoladas aleatoriamente da superfície de plantas, são inoculadas individualmente em sementes, raízes, ou parte aérea. As plantas inoculadas são comparadas a plantas não inoculadas em ensaios biológicos. Nestes bioensaios, *Pseudomonas* spp. têm sido objeto de intensa pesquisa, pelo seu efeito supressivo a diversos fitopatógenos. Um ensaio significativo feito em casa-de-vegetação, utilizou uma coleção de bactérias para avaliar o potencial de supressão a “damping-off”, causado por *Pythium* spp. Constatou-se que grande parte da coleção era formada por *Pseudomonas* fluorescentes efetivas para o biocontrole (LOPER et al., 1997).

## **3. Mecanismos de supressão às doenças**

A supressão de doenças é consequência de diversos mecanismos. A competição por nutrientes e a ocupação por sítios de infecção são apontadas como responsáveis por alguns processos de supressão.

KIM, B. S.; LEE, J. Y.; HWANG, B. K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. **Pest Management Science**, England, v. 56, p. 1029-1035, 2000.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N.; MILLER, T. D. Effect of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 7, p. 1078-1082, 1980.

KRAUS, J.; LOPER, J. E. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium ultimum* damping-off of cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 264-271, 1992.

KRAUS, J.; LOPER, J. E. Characterization of a genomic region required production of the pyoluteorin by biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 849-854, 1995.

LANDA, B. B.; MAVRODI, O. V.; RAAIJMAKERS, J. M.; McSPADDEN-GARDENER, B. B.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3226-3237, 2002.

LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS, J. M.; ALABOUVETTE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum Usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1004-1012, 1995.

LEVY, E.; GOUGH, F. J.; BERLIN, K. D.; GUIANA, P. W.; SMITH, J. T. Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. **Plant Pathology**, St. Paul, v. 41, p. 335-341, 1992.

GEORGAKOPOULOS, D.; HENDSON, M.; PANOPOULOS, N. J.; SCHROTH, M. N. Analysis of expression of a phenazine biosynthesis locus from *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 on seeds with a mutant carrying a phenazine biosynthesis locus-ice nucleation reporter gene fusion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 4573- 4579, 1994b.

GOHEL, V.; SINGH, A.; VIMAL, M.; ASHWINI, P.; CHHATPAR, H. S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 54-72, 2006.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 4, p. 307-319, 2005.

HAMMER, P. E.; HILL, D. S.; LAM, S. T.; VAN PÉE, K. H.; LIGON, J. M. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.6, p.2147–2154, 1997.

KAUR, R.; MACLEOD, J.; FOLEY, W.; NAYUDU, M. Gluconic acid: an antifungal agent produced by *Pseudomonas* species in biological control of take-all. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, n. 6, p. 595-604, 2006.

KEEL, C.; SCHNIDER, U.; MAURHOFER, M.; VOISARD, J.; LAVILLE, P.; BURGER, P.; WIRTHNER, P.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the secondary metabolite ,2-4- diacetylphloroglucinol. **Molekular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 5, p. 4-13, 1992.

KEEL, C.; WELLER, D. M.; NATSCH, A.; DEFAGO, G.; COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 552-563, 1996.

A bacterização de sementes de soja e ervilha com *P. putida* estirpe N1R, controlou o “damping-off”, causado por *Pythium ultimum*, devido a competição por compostos voláteis que poderiam servir de indutores ou nutrientes para o fungo (PAULITZ, 1991). A alocação de fotossintatos na superfície da raiz pode chegar até 40% (DEGENHARDT et al., 2003). A competição por estes nutrientes e nichos naquele ambiente é um mecanismo importante pelo qual as PGPR protegem as plantas de fitopatógenos (COMPANT et al., 2005). As PGPR atingem a superfície da raiz guiadas pelas sua motilidade e pela quimioatração que certos exsudatos possuem sobre estes organismos. Além disto, estes exsudatos podem ter ação antimicrobiana, e conseqüentemente, promover vantagem, naquele nicho ecológico, aos organismos que possuem sistema enzimático para degradação daqueles compostos (BAIS et al., 2004).

A resistência induzida é um outro mecanismo de supressão e pode ser de dois tipos. As plantas possuem um mecanismo de resistência induzida, conhecido, em inglês, por “Systemic Acquired Resistance” – SAR. Este sistema é acionado quando a planta ativa seu mecanismo de defesa em resposta a uma infecção primária por um patógeno, principalmente quando este induz reação de hipersensibilidade, através da qual a infecção fica restrita ao local da lesão necrótica (VAN LOON et al., 1998). A resistência induzida (“Induced Systemic Resistance” – ISR) é causada pelas PGPR. Estas desencadeiam na planta uma resposta defensiva à presença do patógeno, pela produção de determinadas substâncias. VAN PEER et al. (1991) demonstraram que a bacterização de raízes de cravo com *P. fluorescens* estirpe WCS374 reduziu significativamente a murcha causada por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*. Foi observado que grande quantidade de antranilato derivado das diantalexina e um grupo das diantramidas se acumularam em plantas que receberam o tratamento com a estirpe. A ISR desencadeada por PGPR causa o espessamento da parede celular das plantas, altera a fisiologia do hospedeiro e sua resposta metabólica, levando a um aumento na síntese de compostos químicos utilizados na defesa vegetal, quando exposto a patógenos e/ou a fatores abióticos (RAMAMOORTHY et al., 2001).

Mudanças bioquímicas e fisiológicas nas plantas estão ligadas, também, à acumulação induzida de proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas PR), quitinases e algumas peroxidases (RAMAMOORTHY et al., 2001). Porém algumas PGPR, não induzem a produção das proteínas PR (VAN WEES et al., 1999; RAMAMOORTHY et al., 2001), mas aumenta acumulação de peroxidases, fenilalanina amonia liase, fitoalexinas, polifenol oxidase e/ou chalcona sintase (COMPANT et al., 2005). Recentemente, foi observado que a indução de alguns destes compostos da defesa vegetal podem ser ativados pelas mesmas N-acil homoserina lactonas que as bactérias utilizam para sinalização intraspecifica (em COMPANT et al., 2005). Alguns genes envolvidos na biossíntese de antibióticos (como o gene *phlD* da biossíntese de fluoroglucinol), possuem alta homologia com genes de plantas envolvidos na defesa vegetal (ex: chalcona sintases) (BANGERA & THOMASHOW, 1999). Isto sugere a mesma origem evolucionária ou, ainda, a troca de genes entre as espécies.

A produção de metabólitos por várias PGPRs, como sideróforos, cianetos, enzimas líticas, enzimas desintoxicantes, antibióticos, é considerado o principal mecanismo de controle biológico de fitopatógenos. Para sobreviver em condições de baixa disponibilidade de Ferro, alguns microrganismos produzem substâncias denominadas sideróforos capazes de formar complexos com o  $Fe^{+3}$ . A capacidade de capturar  $Fe^{+3}$  do ambiente varia com a PGPR. Porém, geralmente, estas bactérias capturam este o elemento dos fungos fitopatogênicos porque os sideróforos formados por estes, possuem uma menor afinidade (O'SULLIVAN & O'GARA, 1992).

As *Pseudomonas* do solo produzem sideróforos verde-amarelados, fluorescentes, solúveis em água e podem ser do grupo dos hidroximatos ou dos fenolatos (RAYMOND et al., 1984). Estes sideróforos são classificados como pioverdinas ou pseudobactinas. A competição por ferro, mediada por pioverdina, é um importante mecanismo para controle biológico (LOPER & BUYER, 1991). Porém, estes sideróforos contribuem para o controle apenas de certas doenças e são eficazes somente quando os fatores

DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BALDWIN, I. T.; KESSLER, A. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 169-176, 2003.

DE SOUZA, J. T.; WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M. Frequency, diversity and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 54-63, 2003a.

DE SOUZA, J. T.; DE BOER, M.; DE WAARD, P.; VAN BEEK, T. A.; RAAIJMAKERS, J. M. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptides surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7161-7172, 2003b.

FENTON, A. M.; STEPHENS, P. M.; CROWLEY, J.; O'CALLAGHAN, M.; O'GARA, F. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 3873-3878, 1992.

FONSECA, M. C. **Diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescente no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)**. 2003. 136 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FUQUA, C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 727-751, 1996

GEORGAKOPOULOS, D.; HENDSON, M.; PANOPOULOS, N. J.; SCHROTH, M. N. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2931-2938, 1994a.

BAILEY, K. L.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 72, p. 169–180, 2003.

BERGSMA-VLAMI, M.; PRINS, M. E.; RAAIJMAKERS, J. M. Influence of plant species populations dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 52, p. 56-69, 2005.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doença de plantas. In: \_\_\_\_\_. **Controle biológico de doença de plantas**. Jaguariúna: Embrapa/CNPDA, 1991. p. 1-5.

BOTELHO, G. R. **Seleção de *Pseudomonas* fluorescentes para controle biológico da podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* em soja (*Glycine max* L.)**. 2001. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

BOTELHO, G. R.; GUIMARÃES, V.; De BONIS, M.; FONSECA, M. E. F.; HAGLER, A. N.; HAGLER, L. C. M. Ecology of a plant growth-promoting strain of *Pseudomonas fluorescens* colonizing the maize endorhizosphere in tropical soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, p. 499-504, 1998.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiologist**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The natural and practice of biological control of plant pathogens**. Minesota: APS, 1989.

COOK, R. J.; THOMSHOW, L. S.; WELLER, D. M.; FUJIMOTO, D.; MAZZOLA, M.; BANGERA, G. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 4197- 4201, 1995.

físicoquímicos que determinam a disponibilidade de ferro no solo são favoráveis (KRAUS & LOPER, 1992).

A produção de cianeto (HCN) tem sido apontada, também, como sendo um fator de inibição de doenças. Certas *Pseudomonas* são capazes de inibir fungos fitopatogênicos através da produção de cianeto (VOISARD et al., 1989). Entretanto, alguns autores têm relatado efeitos deletérios de HCN em plantas (BAKKER & SCHIPPERS, 1987). Porém, observa-se que esta resposta à presença de HCN na rizosfera é variável para cada tipo de planta.

Várias espécies de PGPR são capazes de produzir enzimas líticas (COMPANT et al., 2005). Segundo LIM et al. (1991) demonstraram que uma estirpe de *P. stutzeri* produzia quitinase e laminarinase, enzimas que podem digerir e lisar micélio do *F. solani*. Apesar da importância deste mecanismo, apenas recentemente, foram intensificados estudos sobre o assunto. Pouco ainda se conhece sobre bactérias que possuem este mecanismo, sendo necessárias avaliações mais refinadas, para que sejam utilizadas como agentes do controle biológico (GOHEL et al., 2006).

Um outro mecanismo de controle biológico é a desintoxicação de fatores de virulência dos patógenos. As PGPR são capazes de sintetizar substâncias que ligam ou degradam as fitotoxinas liberadas por patógenos (BASNAYAKE & BIRCH, 1995). Atualmente, foi relatado que algumas PGPR podem degradar sinais de auto indutores, inviabilizando a capacidade de “quorum-sensing” do patógeno, e conseqüentemente impedindo a expressão de vários genes ligados à virulência (MORELLO et al., 2004; MOLINA et al., 2003).

#### **4. Antibiose e supressividade**

---

Vários estudos têm demonstrado a eficiência no controle biológico de compostos com ação antimicrobiana, excretados por *Pseudomonas* fluorescente (NIELSEN et al., 2000; HAMMER et al., 1997; KEEL et al., 1992; THOMASHOW et al., 1990). Os biosurfactantes são polímeros de baixo peso molecular que diminuem as tensões superficial e interfacial e polímeros de alto

peso molecular que se ligam à superfícies (RON & ROSENBERG, 2001). Algumas *Pseudomonas* são capazes de produzir estes compostos. Alguns destes biosurfactantes possuem atividade antimicrobiana, como rhamnolipídeos (RHLs) e peptídeos biosurfactantes. Os RHLs apresentaram atividade contra zoosporos de oomicetos, causando a imotilidade e a lise de zoosporos em menos de um minuto (STANGHELLINI & MILLER, 1997). A germinação de esporos de *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum orbicularie* foi inibida *in vitro* por RHL B produzido por *P. aeruginosa* B5 (KIM et al., 2000). As *Pseudomonas* produzem uma série de lipopeptídeos surfactantes que apresentam atividade antimicrobiana. A viscosinamida e tensina produzidas por estirpes de *Pseudomonas* solo foram capazes de inibir o crescimento micelial de vários fungos (THRANE et al., 1999; NIELSEN et al., 2000).

Vários antibióticos produzidos por *Pseudomonas* spp. (NIELSEN et al., 2002; RAAIJMAKERS et al., 2002; DE SOUZA et al., 2003ab) que estão associados à supressividade em solos (THOMASHOW & WELLER, 1988; RAAIJMAKERS et al., 1997). Define-se como solo supressivo, aqueles nos quais o patógeno não se estabelece ou se estabelece mas causa pouco ou nenhum dano a planta, ou ainda, quando se estabelece e causa doença por um período, mas perde rapidamente a infectividade. A supressão pode ser geral ou específica. A supressão geral está diretamente relacionada à atividade microbiana, não havendo um microrganismo ou grupo específico responsável pela ação. A supressão específica é resultado do efeito de indivíduos ou determinados grupos de microrganismos antagonistas aos patógenos que agem durante certo estágio do ciclo de vida do patógeno. São descritos vários solos supressivos a determinadas doenças vegetais. O mecanismo de supressão está relacionado à capacidade do microrganismo em competir com fitopatógenos (COOK & BAKER, 1989). O antagonismo de espécies de *Pseudomonas* fluorescentes é responsável pelos solos supressivos ao *F. oxysporum*, causador de murchas (SCHER & BAKER, 1982). As *Pseudomonas* têm papel relevante na inibição de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, causador da "Podridão do Pé" em trigo (WELLER & COOK, 1983). As estirpes de *P. fluorescens* 2-79 e *P. aureofaciens* 30-89 isoladas

solos de Cerrado sob cultivo da soja, onde não foi detectada a incidência da doença "Podridão Vermelha da Raiz", causada por *Fusarium solani*. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para determinar sua existência e função efetiva, e/ou ainda, detectar novos compostos, considerando-se a biodiversidade dos ambientes tropicais.

## 8. Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, M. Ecological interrelationships: Microbiology of rhizosphere. In:\_\_\_\_\_. **Soil microbiology**. 2. ed. New York:: Wiley Eastern, 1977. p. 423-437.
- BAIS, H. S.; PARK, S. W.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends Plant Sciences**, London, v. 9, p.26-32, 2004.
- BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in the relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 451- 457, 1987.
- BANGERA, M. G.; THOMASHOW, L. S. Characterization of a genomic locus required for synthesis of antibiotic 2,4 diacetylphloroglucinol by biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 9, p. 83-90, 1996.
- BANGERA, M. G.; THOMASHOW, L. S. Identification and characterization of gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4 – diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 18., 3155-3163, 1999.
- BASNAYAKE, W.; BIRCH, R. G. A gene from *Alcaligenes denitrificans* that confers albicidin resistance by reversible antibiotic binding. **Microbiology**, New York, v. 141, p. 551-560, 1995.

apresentou alguns indivíduos capazes de inibir o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* (Figura 2), assim como *in vivo* quando inoculados em alface (FONSECA, 2003). A possibilidade da inibição ser determinada por antibióticos, está sendo avaliada através da pesquisa de genes da produção de fenazina e fluoroglucinol nos isolados. Análises preliminares indicam a presença de genes para produção de antibióticos nos isolados. Porém, os dados não são suficientes para relacionar a baixa incidência de doenças no SIPA com a produção de antibióticos.

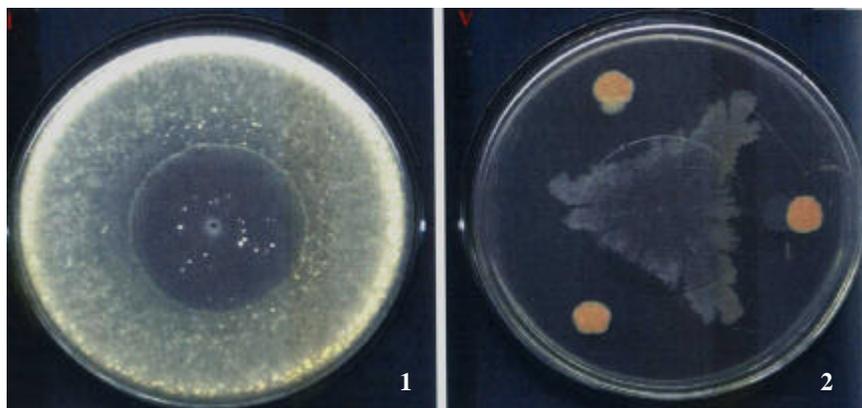


Figura 2 – Antagonismo *in vitro*. (1) *Sclerotinia sclerotiorum*; (2) crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* inibido por isolados de *Pseudomonas fluorescens* (FONSECA, 2003).

## 7. Conclusão

A importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas* fluorescente para o controle biológico é reconhecida, especialmente quando se trata de solos supressivos. Diversos trabalhos de diferentes partes da Terra mostram a eficiência destes antibióticos produzidos por *Pseudomonas* fluorescente no controle de doença de plantas, sugerindo a universalidade deste mecanismo. Entretanto, pouco ainda se conhece sobre estes antibióticos em solos tropicais. BOTELHO (2001) detectaram a presença de expressiva comunidade de *P. fluorescens* produtoras de PCA, em

de solo supressivo a esta doença produziram antibióticos do grupo das fenazinas, como o ácido monocarboxílico fenazina (“Phenazine-1-Carboxylic Acid” – PCA). Outro grupo de antibióticos, os fluoroglucinóis, foram produzidos pela estirpe de *P. fluorescens* Q2-87 isolada destes solos. Este antibiótico se mostrou mais efetivo contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, sendo considerado o principal fator de inibição ao fungo (RAAIJMAKERS et al., 1997). Recentemente, o ácido D-gluconíco foi considerado o antifúngico mais eficiente produzido pela estirpe AN5 de *Pseudomonas* spp. no controle da “Podridão do Pé”. Isto indica que diversos compostos podem estar associados à supressão de uma mesma doença, sendo, portanto, necessárias contantes avaliações para detectá-los (KAUR et al., 2006)

Estudos moleculares identificaram vários genes de *Pseudomonas* spp. fluorescente que produzem um ou mais antibióticos, como fenazina, fluoroglucinol, pirrolnitrina e pioluteorina (WELLER & THOMASHOW, 1993) (Figura 1). Avaliações envolvendo estudos moleculares e de genética, associadas às análises específicas e a sistemas de detecção ratificaram que a supressão de algumas doenças de raízes é mediada por antibióticos produzidos por PGPRs na rizosfera (COOK et al., 1995). A estratégia básica, extensamente empregada para determinar a função de um gene específico ou de certa característica num processo de Biocontrole por PGPR, envolve: desenvolvimento de avaliação que demonstre a atividade no controle biológico; seleção de estirpes naturais com atividade antagonística; mutagênese das estirpes; procura de mutantes que não apresentem a característica desejada; preparação de biblioteca genômica do DNA original e complementação dos mutantes para restaurar a característica desejada (WELLER & THOMASHOW, 1994).

Os loci biossintéticos de alguns antibióticos foram clonados e completamente sequenciados. (BANGERA & THOMASHOW, 1996; HAMMER et al., 1997; KRAUS & LOPER, 1995; MAVRODI et al., 1998). Os resultados obtidos pela aplicação de técnicas moleculares e isolamento direto do antibiótico demonstram que efetivamente, estes antibióticos são produzidos na espermosfera e rizosfera e têm grande importância na supressão de patógenos de plantas

existentes no solo (THOMASHOW & WELLER, 1988; WELLER & THOMASHOW, 1993; KRAUS & LOPPER, 1995). Atualmente, a fenazina e o fluoroglucinol são os metabólitos mais intensamente pesquisados.

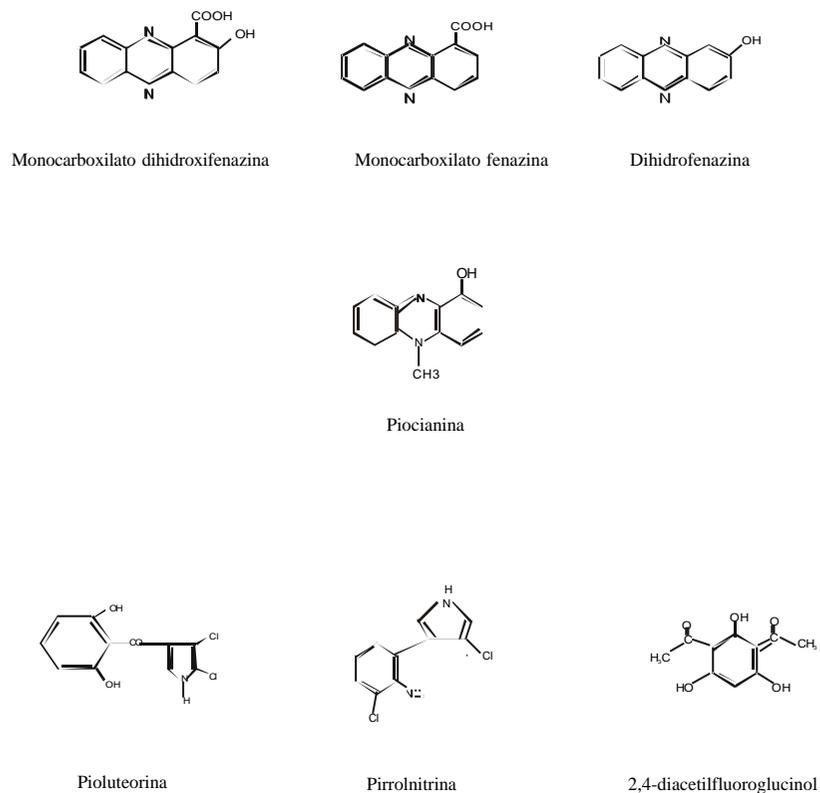


Figura 1 – Alguns antibióticos produzidos por *Pseudomonas spp. fluorescentes*

Fenazinas são compostos heterocíclicos nitrogenados e pigmentados produzidos por bactérias pela via do ácido chiquímico (TURNER & MESSENGER, 1986) e nas estirpes de *P. fluorescens* 2-79 e de *P. aureofaciens* 30-84 são responsáveis pela supressão da “Podridão do pé” em trigo e cevada. Ambas estirpes produzem o ácido monocarboxílico fenazina (PCA), mas a estirpe 30-84, também produz os derivados do PCA, ácido monocarboxílico

teve um efeito significativo na produção de DAPG por populações produtoras nativas. (BERGSMA-VLAMI et al., 2005).

## 6. Manejo agrícola e o controle biológico de doenças

A importância dos antibióticos para o Controle Biológico e, de maneira geral, para o antagonismo microbiano no ecossistemas é atualmente reconhecida. O solo é dos mais ricos ambientes onde há vários tipos de interações entre microrganismos. Deste modo, é possível manipular certas características para favorecer antagonismo. A utilização de práticas agrícolas menos impactantes, como plantio direto, adubação verde e rotação de culturas (PETERS et al., 2003; BAILEY & LAZAROVITS, 2003) favorecem o equilíbrio, reduzindo a incidência de problemas fitossanitários. Sabe-se que a adição de matéria orgânica ao solo contribui substancialmente para a diminuição desses problemas. Isto também é resultante da intensificação da competição entre microrganismos do solo por nitrogênio, carbono ou ambos, expressa pela redução do número de propágulos viáveis ou pela menor taxa de crescimento dos patógenos (COOK & BAKER, 1989). Estas práticas permitem a manipulação do ecossistema do solo para estimular o controle biológico resultando em fonte de potentes microrganismos antagonistas adaptados à introdução em solo ou rizosfera.

O SIPA<sup>1</sup> (Sistema Integrado de Produção Agroecológica – Seropédica/RJ) tem como objetivo o estudo e divulgação de práticas alternativas, com base nos princípios da agricultura orgânica, caracterizando-se pela agrobiodiversidade, sem emprego de agrotóxicos e adubos nitrogenados solúveis, bem como pelo uso rotineiro de práticas de conservação do solo. Nesta área, observou-se que a incidência de doenças não tem causado danos econômicos significativos. A partir destas observações, as *Pseudomonas* fluorescente têm sido alvo de estudo. Algumas coleções foram formadas e uma delas foi testada quanto a capacidade de inibição de fitopatógenos. Esta coleção formada por isolados obtidos de plantio consorciado de cenoura e alface,

<sup>1</sup> Convênio Embrapa-Agrobiologia, Pesagro e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ligada aos genes *phzR* and *phzI* membros do grupo de genes *luxI/luxR* e localizados acima do operon da fenazina (WOOD & PIERSON, 1996; THOMASHOW & MAVRODI, 1997). PhzR é um ativador de transcrição da expressão do gene da fenazina que funciona respondendo a acumulação de autoindutor dependente da densidade de células (“acylated homoserine lactone” - AHL), cuja síntese requer o gene *phzI* (THOMASHOW & MAVRODI, 1997). A regulação da produção de fenazina na estirpe PAO1 de *P. aeruginosa* é bastante complexa, envolve também as proteínas LasI/LasR, outro grupo de autoindutores e proteínas reguladoras da transcrição. Os dois sistemas de QS estão interrelacionados, havendo uma hierarquia entre eles (PESCI et al., 1997).

## **5. A planta e o efeito na produção de antibióticos**

Apesar do grande número de estudos sobre o efeito planta nas comunidades microbianas, poucos se sabe do efeito das espécies vegetais sobre a dinâmica, composição e atividade das populações bacterianas nativas que possuem atividade antagonistas (BERGSMA-VLAMI et al., 2005). Atualmente, vários estudos estão sendo conduzidos para determinar este efeito (PICARD et al., 2000; RAAIJMAKERS & WELLER, 2001). BERGSMA-VLAMI et al (2005) analisaram a dinâmica, a diversidade genotípica e a atividade de *Pseudomonas* spp. produtoras de 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAPG) na rizosfera de quatro plantas (trigo, beterraba, batata e lírio) cultivadas em dois solos diferentes. Eles observaram que em todas as espécies testadas, exceto no lírio, havia populações relativamente alta de *Pseudomonas* spp. produtoras de DAPG durante cultivos sucessivos ( $10^4$  a  $10^6$  Unidade Formadora de Colônia/g de raiz). Densidades populacionais similares foram observadas na rizosfera de trigo cultivado em solo supressivo a *G. graminis* var. tritici (RAAIJMAKERS et al., 1997; DE SOUZA et al., 2003ab) e também na rizosfera de ervilha cultivada em solo supressivo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (LANDA et al., 2002). Alta densidade foram observadas na rizosfera de tabaco em um solo supressivo a *Thielaviopsis basicola* (RAMMETE et al., 2003). Análises utilizando cromatografia líquida (HPLC – “High Pressure Liquid Chromatography”) mostraram que a espécie vegetal

dihidroxifenazina e dihidroxifenazina (PIERSON III & THOMASHOW, 1992), além do cianeto de hidrogênio. Mutantes deficientes na produção de fenazina de 2-79 e 30-84 reduziram a habilidade de supressão da doença enquanto a complementação genética restaurou a atividade de biocontrole comparável a das estirpes originais. As duas estirpes foram isoladas de raízes de trigo cultivado em solos dos Estados Unidos da América, naturalmente supressivos à doença. A estirpe de *P. aureofaciens* PGS12 isolada de raiz de milho também produz fenazina (GEORGAKOPOULOS et al., 1994a). Esta estirpe mostrou ter um amplo espectro de ação contra fitopatógenos e produz, PCA e duas dihidroxifenazinas, além de cianeto de hidrogênio, pirrolnitrina e ácido indolacético (GEORGAKOPOULOS et al., 1994a; 1994b). Uma coleção de *Pseudomonas* fluorescente foi obtida da rizosfera de soja, de uma região onde não foi observado o sintoma da doença ‘Podridão Vermelha da Raiz’, causada por *Fusarium solani*. Observou-se que mais de 50% dos isolados que foram selecionados pela capacidade de antibiose *in vitro* apresentaram os genes da síntese de fenazina, indicando que a comunidade de produtores de antibióticos no local era abundante (BOTELHO et al., 1998).

A biossíntese de fenazina não está associada somente à inibição de doenças radiculares, mas, também, à capacidade adaptativa do microrganismo ao ambiente. A produção de fenazina está associada à competitividade e persistência das estirpes 2-79 (*P. fluorescens*) e 30-84 (*P. aureofaciens*). As populações de mutantes não produtoras de fenazinas de ambas estirpes reduziram mais rapidamente que as das estirpes originais ou dos mutantes complementados em rizosfera ou solo, mas não em solo pasteurizado, sugerindo que o antibiótico contribui para competitividade contra os microrganismos naturais. Foi observado, também que a perda da habilidade em produzir fenazina, resultou na redução da sobrevivência em solo natural e colonização da rizosfera de trigo (MAZZOLA et al., 1992).

Os grupos de genes de fenazina das estirpes 2-79 e 30-84 são extremamente conservados. Cada grupo tem aproximadamente 8,5kb e incluem genes regulatórios designados *phzI* e *phzR* (PIERSON III et al., 1995; WOOD & PIERSON III, 1996; MAVRODI

et al., 1998), assim como, um operon com sete genes biossintéticos designados *phzABCDEFG* em 2-79 (MAVRODI et al., 1998) que corresponde a *phzXYABCDE* em 30-84 (PIERSON III et al., 1995; MAVRODI et al., 1998). A expressão de *phzFAB* em 30-84 é necessária para produção de PCA em *Escherichia coli* e *phzC* está envolvido na conversão de PCA para ácido monocarboxílico dihidroxifenazina (PIERSON III & THOMASHOW, 1992; PIERSON III et al., 1995). MAVRODI et al. (2001) observaram que das *Pseudomonas* spp. testadas, somente a *P. aeruginosa* possuía duas cópias do operon de fenazina. Esta cópias eram homólogas aos loci biossintéticos de *P. aureofaciens*, *P. fluorescens* e *P. chlororaphis* e funcionais, pois permitiram a síntese de PCA quando introduzidas em uma estirpe de *P. fluorescens* não produtora. Este estudo também, indicou o PCA como o precursor de outras fenazinas.

Fluoroglucínóis são metabólitos fenólicos encontrados em bactérias e plantas, com atividade antifúngica e antibacteriana (KEEL et al., 1992; LEVY et al., 1992), fitotóxica (KEEL et al., 1992), antiviral e anti-helmíntica. O 2-4 diacetilfluoroglucínol (PhI) é o mais estudado, pois é produzido por *Pseudomonas* spp. fluorescentes originárias de várias partes da Terra (KEEL et al., 1992; LEVY et al., 1992; FENTON et al., 1992). É considerado o principal ou mesmo o único metabólito associado à supressão de vários patógenos (WELLER & THOMASHOW, 1993). A estirpe de *Pseudomonas fluorescens* CHAO foi isolada de solo supressivo à doença “Podridão Negra da Raiz” do tabaco causado por *Thielaviopsis basicola*, na região de Morens –Suíça (STUTZ et al., 1986). Esta estirpe produz fluoroglucínol (PhI), assim como, monoacetilfluoroglucínol, cianeto de hidrogênio, pioluteorina e vários compostos bioativos (VOISARD et al., 1994). O PhI contribui para a supressão da “Podridão Negra da Raiz” em tabaco e é um dos principais determinantes na supressão da “Podridão do Pé” em trigo, causado por *G. graminis* var. *tritici* (KEEL et al., 1992). Um mutante Tn5 PhI<sup>-</sup> da estirpe CHAO foi menos inibitório à *T. basicola* e *G. graminis* var. *tritici*. A complementação do mutante, com fragmento de 11 kb da biblioteca genômica da estirpe CHAO, restaurou amplamente a produção de PhI, a inibição do fungo e a supressão de doenças. O PhI também pode ser isolado da rizosfera de trigo colonizado pela estirpe original

ou pelo mutante complementado (KEEL et al., 1992).

Os genes para produção deste antibiótico estão contidos em um fragmento de DNA genômico de 6,5kb que é capaz de transferir a capacidade biossintética do PhI, para estirpes de *Pseudomonas* que não produzem o antibiótico (BANGERA & THOMASHOW, 1996). Observou-se que o locus responsável pela produção de PhI, é extremamente conservado entre as *Pseudomonas* associadas às raízes ao redor do mundo (KEEL et al., 1996). A análise do fragmento de DNA de 6,5kb revelou seis “Open Reading Frames” (ORFs). Os designados como *phIA*, *phIC*, *phIBI* e *phID* estão contidos numa unidade de transcrição única necessária para produção de PhI (BANGERA & THOMASHOW, 1996; 1997). Este grupo de genes está margeado de um lado por um gene transcrito divergentemente, designado *phIF*, e do outro lado, por um gene colinear, mas transcrito separadamente, *phIE*. O *phIF* é um regulador da síntese de fluoroglucínol, enquanto o produto de *phIE*, uma permease da membrana, pode funcionar como exportador de PhI. Este, também, está associado ao pigmento vermelho presente no meio quando PhI é produzido (BANGERA & THOMASHOW, 1996; 1997; KEEL et al., 1996).

*Pseudomonas* fluorescente possuem sistemas de autoregulação ou “quorum-sensing” (QS) para regular algumas características que poderiam afetar sua persistência e viabilidade na superfície das plantas ((LOH et al., 2002). “Quorum sensing” é um mecanismo pelo qual as bactérias podem se comunicar através de moléculas sinalizadoras, conhecidas como N-acilhomoserina lactonas (AHLs). Através destas moléculas produzidas por elas próprias ou outras células, as bactérias podem monitorar quando um “quorum” de células bacterianas foi alcançado para exibir um comportamento multicelular em termos de expressão gênica (FUQUA et al., 1996). A produção de vários metabólitos secundários é regulada por estes sistemas. Os sistemas regulam a produção de antibióticos and metabólitos secundários, atividade de exoproteases e características da superfície celular (LOH et al., 2002; ZHANG & PIERSON III, 2001). A produção de fenazina é regulada por QS e um sistema de transdução com dois sinais altamente conservado (PIERSON et al., 1998). A regulação da produção de fenazina está