

IDENTIFICAÇÃO DE UMA BACTÉRIA DO GÊNERO *Bacillus* COM ATIVIDADE ANTAGONISTA AO FUNGO *Moniliophthora perniciosa*, CAUSADOR DA VASSOURA DE BRUXA NO CACAUEIRO

TEIXEIRA, P.J.*; FERRAZ, M.M.G.; BROCCHI, M.; LEITE, D.S.; MONDEGO, J.M.C.; PEREIRA, G.A.G.
 *Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Unicamp
 Apoio financeiro: Fapesp

Palavras chaves: Vassoura de Bruxa - *Moniliophthora perniciosa* - *Bacillus*

Introdução

Resultados e Discussão

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* é o agente etiológico da Vassoura de Bruxa, principal doença que ataca o cacaueteiro. Até o final da década de 80, o Brasil detinha a segunda maior produção de cacauete do mundo. Com a chegada da Vassoura de Bruxa ao sul da Bahia em 1989, principal região produtora brasileira, houve uma redução drástica na produção do país, que passou a ser importador do produto (Fig. 1). Apesar dos avanços na busca por soluções para o problema, ainda não há uma maneira eficaz de controle da doença.

A exemplo da descoberta da penicilina, muitos antibióticos foram identificados ao acaso a partir de contaminações. Ao se realizar o cultivo de *M. perniciosa* *in vitro*, observou-se um contaminante cujo crescimento resultou na formação de um halo de inibição na cultura do fungo (Fig. 2). O contaminante foi analisado ao microscópio e caracterizado como um bacilo gram-positivo. Este trabalho mostra a identificação desta bactéria e testes de sua atividade antifúngica.

Inóculo da bactéria em placa de Petri contendo o fungo *M. perniciosa*

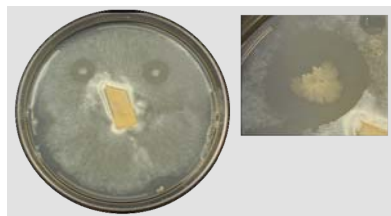


Figura 3. Inóculo da bactéria contaminante diretamente sobre o fungo *M. perniciosa*. Observou-se formação de halo de inibição semelhante ao da cultura original.

O inóculo da bactéria diretamente sobre o fungo resultou em formação de halo de inibição à medida que a colônia da bactéria se desenvolveu (Fig. 3). Desta forma, comprovou-se que o halo de inibição observado na cultura original contaminada foi, de fato, devido à presença da bactéria.

Teste do sobrenadante da cultura da bactéria contra *M. perniciosa*

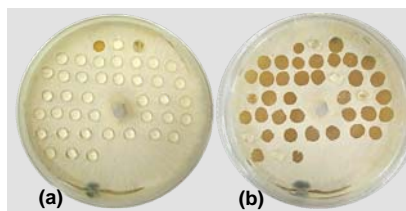


Figura 4. Ação do sobrenadante da cultura da bactéria sobre o fungo *M. perniciosa*. (a) Momento da aplicação de gotas do sobrenadante. (b) Efeito necrótico sobre o fungo poucos minutos após aplicação.

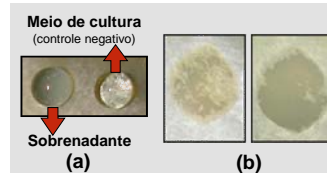


Figura 5. (a) Detalhe do efeito necrótico do sobrenadante sobre o fungo *M. perniciosa*. (b) Progressão do efeito após aplicação. Há desaparecimento gradual do micélio que entrou em contato com o sobrenadante. Fotos tiradas com intervalo de 2 minutos.

Após a comprovação de que a presença da bactéria na cultura do fungo resulta na formação de halo de inibição, o sobrenadante da cultura bacteriana foi aplicado sobre o fungo para verificação da existência de possíveis substâncias secretadas com efeito de inibir o fungo. Surpreendentemente, a aplicação de gotas do sobrenadante sobre o fungo resultou em efeito necrótico em poucos minutos. Este resultado demonstra que o efeito inibitório sobre o fungo é decorrente de uma ou mais substâncias secretadas pela bactéria.

Identificação da bactéria

Através do seqüenciamento do fragmento do gene 16S, a bactéria foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus*, porém a espécie não pôde ser determinada com a seqüência obtida. O seqüenciamento do gene 16S completo, bem como análise do perfil de ácidos graxos estão sendo realizados para que a espécie seja determinada com precisão.

Conclusões e Perspectivas

✓ A bactéria identificada inicialmente como uma contaminação na cultura do fungo *M. perniciosa* produz uma ou mais substâncias que tem efeito necrótico sobre o fungo. Testes quanto a inibição de outros fungos estão em andamento.

✓ O efeito antifúngico quase instantâneo é surpreendente e pode indicar que a substância tenha efeito direto na estrutura de *M. perniciosa*. A aplicação do sobrenadante da bactéria sobre folhas de cacaueteiro não resultou em nenhum efeito.

✓ Análises químicas com os metabólitos produzidos por esta bactéria estão sendo realizadas para identificação da substância responsável pelo efeito antifúngico.

Metodologia

Inóculo da bactéria em placa de Petri contendo o fungo *M. perniciosa*

Bactérias da cultura contaminada (Fig. 2) foram inoculadas diretamente sobre o fungo *M. perniciosa* cultivado em placa de Petri com objetivo de verificar a ocorrência de halo de inibição semelhante ao original.

Teste do sobrenadante da cultura da bactéria contra *M. perniciosa*



1. Bactéria cultivada em meio sólido
2. Inóculo em meio líquido e cultivo durante 16h
3. Separação das células por centrifugação e filtração
4. Aplicação do sobrenadante sobre o fungo

Identificação da bactéria

A identificação da espécie da bactéria foi realizada através do seqüenciamento de um fragmento do gene codificador do RNA ribossômico 16S. A seqüência obtida foi, então, comparada com seqüências depositadas em bancos de dados públicos.

1990/1991		2006/2007	
1 Costa do Marfim	32,1%	1 Costa do Marfim	36,47%
2 Brasil	14,69%	2 Gana	18,25%
3 Gana	11,71%	3 Indonésia	14,3%
4 Malásia	8,82%	4 Nigéria	5,64%
5 Nigéria	6,38%	5 Camarões	4,98%
6 Indonésia	5,97%	6 Brasil	3,74%

Figura 1. Queda na produção brasileira de cacauete após introdução da Vassoura de Bruxa no sul da Bahia, principal região produtora do país. De grande exportador o Brasil passou a importador.

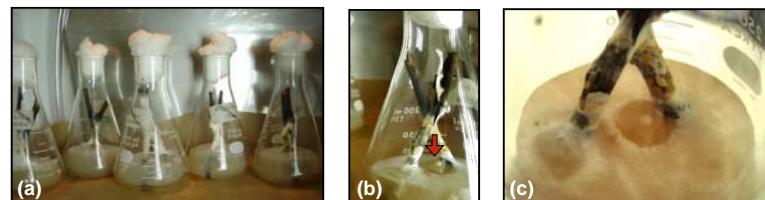


Figura 2. Contaminação da cultura do fungo *M. perniciosa*. (a) O fungo é cultivado em erlenmeyers contendo ramos esterilizados de cacaueteiro com o objetivo de induzir a produção *in vitro* de basidiomas. (b) Em uma destas culturas observou-se que a presença de uma bactéria contaminante (seta) resultou na formação de halo de inibição no fungo. (c) Detalhe do halo de inibição.