



AVALIAÇÃO DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE GIRASSOL COM ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA CONTRA O FITOPATÓGENO *Alternaria alternata*

Tiago Tognolli de Almeida¹; Sandro Augusto Rhoden²; Aretusa Cristina Felber³; João Lúcio de Azevedo⁴; João Alencar Pamphile⁵

RESUMO: Originário da América do Norte o Girassol, que pertence à família Compositae, é cultivado no Brasil, pois o clima se apresenta propício para o cultivo. Em outros países o girassol também apresenta valor comercial na produção de óleo vegetal. Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem em tecidos vegetais, ocupando espaços inter ou intracelulares. Suas relações com a planta hospedeira podem estar entre a neutralidade e a produção de substâncias que inibem a herbivoria ou mesmo promovendo o crescimento da planta. Já foram descritas várias substâncias produzidas por estes organismos que são capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos patogênicos. A técnica de cultura pareada foi realizada de acordo com Campanile et al. (2007) modificada, onde o fitopatógeno *Alternaria alternata* e o isolado endofítico são colocados para crescer em meio BDA em pólos opostos da placa a 1 cm da borda, em triplicata. O cálculo do Índice de Antagonismo (IA) foi calculado para todos os endófitos testados de acordo com a fórmula: $IA = (RM - rm)/RM \times 100$, onde: RM = média dos raios nas outras três direções e rm = raio da colônia em direção ao antagonista. Os isolados o IG03, IG06 e IG15 testados contra o fitopatógeno apresentaram respectivamente índice de inibição de 20,94%, 37,67% e 22,75%. Estes resultados indicam que estes fungos apresentam potencial biotecnológico para a inibição do fitopatógeno *Alternaria alternata*.

PALAVRAS-CHAVE: Antagonismo; Biotecnologia; Endofíticos; Girassol; Microrganismos.

INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos ou endófitos são microrganismos que vivem no interior de tecidos ou órgãos dos vegetais. Podem habitar o interior de um vegetal durante todo o seu ciclo de vida ou apenas durante uma fase de seu desenvolvimento. Ocorrem especialmente nas partes aéreas de seu hospedeiro, sem produzir nódulos ou outras transformações externas e sem causar malefícios ao vegetal contrariamente, manifestam

¹ Acadêmico do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá – Paraná. totus_tiago@hotmail.com

² Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá – Paraná. Bolsista da Capes sandro_ar@hotmail.com

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá – Paraná. Bolsista da Capes. are264@hotmail.com

⁴ Pesquisador Visitante Nível 1 do CNPq no Departamento de Biologia Celular e Genética - UEM. jazevedo@esalq.usp.br

⁵ Orientador. Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá – Paraná. prof.pamphile@gmail.com

algumas vantagens ao hospedeiro, protegendo-o contra o ataque de insetos e moléstias, modificando a fisiologia da planta hospedeira e produzindo substâncias de interesse biotecnológico (AZEVEDO et al., 2002). O girassol (*Helianthus annuus L.*), família Compositae, é originário da América do Norte. Tal cultura está bem desenvolvida em alguns outros países do mundo. No Brasil, grande parte do território é apto para o cultivo de girassol por apresentar condições climáticas satisfatórias (SICHMANN et al., 1970).

Esta é uma planta com características muito especiais, principalmente em relação ao seu potencial para o aproveitamento econômico do óleo produzido de suas sementes, ração animal, além de ser utilizado na alimentação humana (SMIDERLE, 2000).

A mancha de alternária é uma das principais doenças do girassol, que pode ocorrer em praticamente todas as regiões e em todas as épocas de semeadura. Os danos causados pela doença podem ser atribuídos à diminuição da área fotossintética da planta, devido à formação de manchas foliares e desfolha precoce, devido a infecção com *Alternaria alternata*. Pode ainda resultar na redução do diâmetro dos capítulos, do número de aquênios por capítulo, do peso de 1000 aquênios e do teor de óleo (LEITE, R.M.V.B.C., 1997).

O presente trabalho objetiva avaliar a atividade antagonística de fungos endofíticos isolados de folhas de *Helianthus annuus L.* contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de fungos endofíticos foram coletadas no horto didático da Universidade Estadual de Maringá, de 10 a 30 amostras de folhas de *Helianthus annuus L.* sadias e sem manchas ou qualquer tipo de lesão. A desinfecção superficial das folhas foi realizada segundo Pimentel et al. (2006). As folhas foram lavadas em água corrente, em seguida, as amostras vegetais foram desinfectadas superficialmente por enxágue em etanol 70% (1 minuto), NaOCl 3% (4 minutos), etanol 70% (30 segundos) e enxaguadas uma vez em água destilada autoclavada. As folhas previamente desinfectadas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 2 - 5 mm² e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com 50 µg.ml⁻¹ de Tetraciclina (Sigma®) para inibição do crescimento bacteriano. Como controle negativo, 100 µl da água destilada autoclavada usada no último enxágue da desinfecção superficial foi semeada em placas com BDA. Todas as placas foram incubadas 7 dias a 28° C.

Foram utilizados três fungos endofíticos isolados de folhas de *Helianthus annuus L.*, inicialmente cultivadas no horto didático da Universidade Estadual de Maringá.

A técnica de Cultura Pareada foi realizada de acordo com Campanile et al. (2007), modificada: discos de 6 mm de colônias crescidas por 7 dias do fungo endofítico e fitopatógeno foram inoculados em pólos opostos de placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) (Smith & Onions, 1983), a 4 cm de distância. Os testes foram realizados em triplicata, bem como o controle negativo, com o fitopatógeno em um (C1) ou ambos os pólos das placas (C2). As interações competitivas entre os endófitos e o patógeno foram analisadas segundo a escala de Badalyan (Badalyan et al., 2002). O índice de antagonismo (IA) de cada endófito foi calculado de acordo com Campanile et al. (2007). As placas foram incubadas em BOD a 28°C por 7 dias. O Índice de Antagonismo (IA) foi calculado para todos os endófitos testados de acordo com a fórmula: $IA = (RM - rm)/RM \times 100$, onde: RM = média dos raios nas outras três direções e rm = raio da colônia em direção ao antagonista.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O isolado IG03 em cultura pareada com *A. Alternata* apresentou índice de inibição de 20,94% e interação do tipo A, “deadlock” com contato micelial. O isolado IG06

apresentou índice de inibição de 37,67% e tipo de interação CA2, sobreposição parcial após “deadlock” com contato inicial e, o endófito IG15 apresentou índice de inibição de 22,75% e tipo de interação competitiva do tipo B, à distância sem contato micelial. A observação do tipo de interação se mostra importante para seleção de endofíticos que serão utilizados como possíveis controladores biológicos, pois revela como ocorre a associação entre os dois fungos. Bernardi-Wenzel (2008) em isolados de *L. divaricatae* e Rhoden (2009) com isolados endofíticos de *Trichilia elegans*, utilizando a mesma metodologia, encontraram isolados que inibiram o crescimento deste fitopatógeno. Segundo Meija *et al.* (2008), o endofítico que se apresenta como controlador biológico deve possuir uma boa colonização e índice de crescimento, combinado com graus de antibiose. A afirmação deste autor sugere a importância de combinar informações de campo com testes *in vitro* para obter resultados satisfatórios nas escolhas de controladores biológicos. Os resultados de antagonismo mostram esses dois isolados promissores controladores biológicos. Futuros estudos envolvendo extratos de metabólitos e aplicação sobre cultura do fitopatógeno ainda são necessários para determinar a forma de sua utilização.

Tabela-I: Índice de antagonismo e tipo de interação dos isolados IG06, IG03 e IG15.

Isolado	Índice de antagonismo	Tipo de interação
IG03	20,94%	A
IG06	37,67%	CA2
IG15	22,75%.	B

Fonte: autores

CONCLUSÃO

Os isolados endofíticos de *H. annuus* L. apresentaram inibição em cultura pareada contra a *A. alternata*. O isolado IG03 de 20,94% e interação do tipo A, o IG06 de 37,67% com interação do tipo CA2, e o isolado IG15 22,75% e tipo de interação competitiva do tipo B. A possibilidade do emprego de endofitos como antagonistas do fitopatógeno mostra-se importante, pois terá um baixo impacto ambiental, por se tratar de fungos que não devem causar doenças em plantas. Estes estudos, utilizando isolados de Girassol, são de caráter preliminar, mas abrem um importante leque de opções do ponto de vista biotecnológico na obtenção futura de produtos bioativos.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L.; BARROS, N. M.; SERAFINI, L. A. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: **EDUCS**, 2002, Caxias do Sul – RS, Brasil.
- BERNARDI-WENZEL;. Bioprospecção e caracterização citológica e molecular de fungos endofíticos isolados de *Lueheadivaricata* (Martius et Zuccarini): estudo da interação endófito-planta hospedeira. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá. (2008).
- LEITE, R.M.V.B.C. Doenças do girassol. Londrina: EMBRAPA-CNPSo,1997. 68p. (**EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica**, 19). ISSN: 0100-6703
- MEJÍA, L. C.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; A. ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control** (2008).

RHODEN, S. A.. Bioprospecção e caracterização citológica e molecular de fungos endofíticos foliares isolados de *Trichilia elegans* (Meliaceae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá. (2009).

PIMENTEL IC, GLIENKE-BLANCO C, GABARDO J, STUART RM, AZEVEDO JL. Identification and colonization of endophytic fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.705-11, 2006.

SICHMAN, W., ROCHA, J.L.V. & BIERREGARD, A.C. Sunflowers in Brazil - The Potential of sunflower as na edible oil crop in Brazil Intern. Sunflower Conf.,4. **Proceedings, Memphis, USA**,p. 62- 70. 1970.

SMIDERLE, O. J. **O girassol como alternativa de combustível**. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/artigos>>. Acesso em: 01 abril. 2010.