



## BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE *Trichilia elegans* NO CONTROLE DO FITOPATÓGENO *Moniliophthora perniciosa*

Caroline Menicoze dos Santos<sup>1</sup>; Sandro Augusto Rhoden<sup>2</sup>; Adriana Garcia<sup>3</sup>; Julio Cesar Polonio<sup>4</sup>; Andressa Domingos Polli<sup>5</sup>; João Alencar Pamphile<sup>6</sup>

**RESUMO:** Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos dos vegetais como as folhas, frutos e sementes. A comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, ao contrário dos microrganismos patogênicos não causam prejuízos aos seus hospedeiros. A *Trichilia elegans* A. Juss. pertence a família Meliaceae, sendo que ocorrem cerca de 70 espécies do gênero distribuídas ao longo da região tropical americana. O fungo *Moniliophthora perniciosa* causa a vassoura de bruxa no cacauereiro (*Theobroma cacao* L.) que é um dos principais problemas fitossanitários da cacauicultura mundial. O objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade antagonística *in vitro* de quatro linhagens de bactérias endofíticas isoladas de folhas *Trichilia elegans* contra o fungo fitopatogênico *M. perniciosa*. A técnica foi realizada inoculando um disco de 6 mm de diâmetro do fitopatogênio no centro da placa de Petri, posteriormente foram realizadas duas estrias das bactérias endofíticas, em cada lado do fitopatogênio, a uma distância de dois centímetros e meio, sendo o diâmetro total da placa de 8,7 cm. No controle foi inoculado somente o fitopatogênio também no centro da placa. Todos os testes foram realizados em triplicata. O índice de inibição da bactéria endofítica foi avaliado utilizando o programa imageJ 1.46r. Os índices de antagonismo (Im) foram de: 12,3% (isol. 68), 1,17% (isol. 74) e 1,15 (isol. 70), já o isolado 73 não apresentou inibição. Futuros estudos são necessários para evidenciar o real potencial no controle deste fitopatogênio.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antagonismo; Microrganismos Endofíticos; *Moniliophthora perniciosa*; *Trichilia elegans*.

### 1. INTRODUÇÃO

Endófitos ou microrganismos endofíticos, são aqueles que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos dos vegetais como as folhas, ramos e raízes. A comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, ao

<sup>1</sup> Biomédica e Estagiária do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - Universidade Estadual de Maringá, UEM-Maringá, Paraná e-mail: carolinemenicoze@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutorando do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada – Universidade Estadual de Maringá, UEM e-mail: sandro\_ar@hotmail.com

<sup>3</sup> Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada – Universidade Estadual de Maringá, UEM. e-mail: adrianagarcia.biologa@gmail.com

<sup>4</sup> Acadêmico do curso de Tecnologia em Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - Universidade Estadual de Maringá, UEM. e-mail: julioc\_polonio@hotmail.com

<sup>5</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia - Universidade Estadual de Maringá, UEM. e-mail: andressa\_polli@hotmail.com

<sup>6</sup> Orientador Professor Doutor do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - Universidade Estadual de Maringá, UEM. e-mail: prof.pamphile@gmail.com

contrário dos microrganismos patogênicos não causam prejuízos aos seus hospedeiros. Os endófitos podem desempenhar relevante função para a sanidade vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, podendo atuar no controle de insetos e até proteger a planta contra herbívoros (Peixoto–Neto et al., 2002).

Os microrganismos endofíticos podem beneficiar a planta de diversas formas, seja produzindo substâncias que irão atuar no metabolismo da planta ou conferindo resistência desta contra fitopatógenos, uma vez que se encontram no mesmo nicho, competindo por nutrientes e produzindo substâncias antimicrobianas (Maccheroni et al., 2004; Paz et al., 2007; Kaneko et al., 2010).

A *Trichilia elegans* A. Juss. pertence a família Meliaceae. Ocorrem cerca de 70 espécies do gênero distribuídas ao longo da região tropical americana. Nos remanescentes florestais e nas regiões próximas a Maringá, Paraná, Brasil, três espécies de *Trichilia* podem ser encontradas: *T. catigua* A. Juss (catiguá), *T. elegans* A. Juss. (pau-de-ervilha) e *T. pallida* Sw. (baga-de-morcego). Estas espécies possuem uma ampla distribuição no Sul e na América Central, sendo a *T. elegans* a mais abundante no Sul do Brasil (Souza, 2001). No Brasil, algumas plantas do gênero *Trichilia* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de reumatismo, malária, provocar vômito e também podem possuir caráter purgativo (Garcez et al., 1996).

O fungo *Moniliophthora perniciosa* causa a vassoura de bruxa do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) que é um dos principais problemas fitossanitários da cacauicultura mundial. Este patógeno infecta os tecidos meristemáticos em desenvolvimento: brotos vegetativos, almofadas florais e frutos, provocando sintomas característicos da doença com hipertrofia dos tecidos infectados (Costa et al., 2010).

Bactérias e fungos endofíticos de plantas medicinais ou com propriedades terapêuticas estão sendo cada vez mais estudados a partir de pressupostos de sua interação com a planta, desta forma o objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade antagonística *in vitro* de quatro linhagens de bactérias endofíticas isoladas de folhas *Trichilia elegans* contra o fungo fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

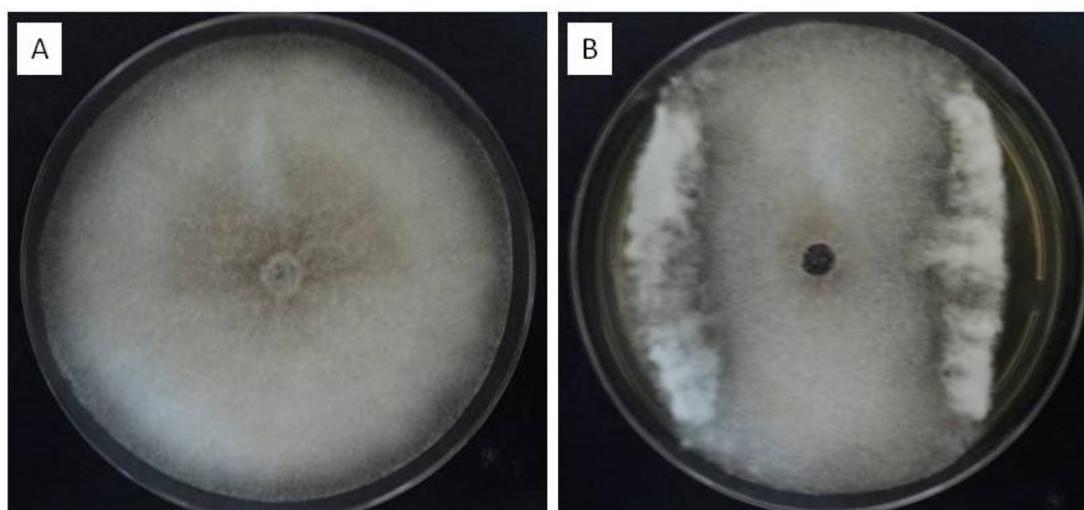
Para a avaliação da atividade antagonística foram utilizadas quatro linhagens de bactérias endofíticas isoladas de folhas de *Trichilia elegans* (isolados 68,70, 73,74) e o fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*. A técnica foi realizada inoculando um disco de 6 mm de diâmetro do fitopatógeno no centro da placa de Petri, contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). As bactérias endofíticas foram previamente repicadas em meio TSB (Trypticase Soy Broth) e incubadas em B.O.D. à 28°C por 24hrs. Posteriormente foram realizadas duas estrias paralelas das bactérias endofíticas, em cada lado do fitopatógeno da placa, a uma distância de dois centímetros e meio do fitopatógeno, sendo o diâmetro total da placa de 8,7 cm.

No controle foi inoculado somente o fitopatógeno. Todos os testes foram realizados em triplicata. O índice de inibição da bactéria endofítica foi avaliado utilizando o programa imageJ 1.46r, pela aferição de área do fitopatógeno em comparação com a área do controle, de acordo com a fórmula:  $I_m = 100 - (MT/MC) \times 100$ , onde  $I_m$  = Índice de inibição em porcentagem do crescimento micelial,  $MT$  = Média da área da triplicata aferida para o tratamento em  $cm^2$ , e  $MC$  = Média da área da triplicata aferida para o controle em  $cm^2$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Organismos endofíticos podem ser incluídos no grupo dos organismos comensais, na qual não tem efeito direto sobre o hospedeiro, ou ainda no grupo dos simbioses mutualísticos que podem ser utilizados no controle biológico de patógenos ou na promoção do crescimento do patógeno (Araújo et al., 2001). Na natureza, interações antagonísticas entre os microrganismos incluem a antibiose, a competição e o parasitismo. Essas interações servem de mecanismos básicos pelos quais os agentes de biocontrole atuam (Valadares-Ingles,2002).

Em relação às bactérias endofíticas isoladas das folhas de, *Trichilia elegans* os índices de antagonismo (Im) foram de: 12,3% (isol. 68), 1,17% (isol. 74) e 1,15 (isol. 70), já o isolado 73 não apresentou inibição. Estes estudos iniciais demonstram que das bactérias endofíticas avaliadas, o isolado 68 (Figura 1) apresentou o maior índice de inibição, sugerindo assim que esses isolados podem ser promissores no controle de *Moniliophthora perniciosa*.



**Figura 1:** Atividade antagonística da Bactéria endofítica isolada de folhas de *T. elegans*. (A); Controle somente com o fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*.(B) Bactéria endofítica (Isol.68) com o fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*.

#### 4. CONCLUSÃO

A análise dos resultados mostrou que as bactérias endofíticas isoladas de *T.elegans* foram promissoras em diferentes porcentagens na inibição do fitopatógenos *M. perniciosa*, porém maiores estudos são necessários para avaliar o real potencial de controle biológico, assim como formas de inoculação e verificação do potencial inibidor destas bactérias na cultura do cacau.

#### 5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L .Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**: Vol. 47, nº3, p. 229-236, 2001.

COSTA, J, de C, B, RESENDE, M. L.V.DE,RIBEIRO-JUNIOR,F.R.C.etal.Indução de resistência em mudas de cacauero contra *Moniliophthora perniciosa* por produto a base de

manoligossacarídeos fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, v.35, September-October 2010, p 285-294.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; RODRIGUES, E. D.; POTT, V. J.; ROQUE, N. F. Seco-protolimonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. **Phytochemistry**, v.42, n. 5, p.1399-1403, 1996.

KANEKO, T., MINAMISAWA, K., ISAWA, T., NAKATSUKASA, H., MITSUI, H., KAWAHARADA, Y., NAKAMURA, Y., WATANABE, A., KAWASHIMA, K., ONO, A., SHIMIZU, Y., TAKAHASHI, C., MINAMI, C., FUJISHIRO, T., KOHARA, M., KATOH, M., NAKAZAKI, N., NAKAYAMA, S., YAMADA, M., TABATA, S., SATO, S. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. **DNA Research**, v.17, n.1, p. 37-50, 2010.

MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

PAZ, Z.; BURDMAN, S.; GERSON, U.; SZTEJNBERG, A. Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meirageulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2570-2579, 2007.

PEIXOTO-NETO, A. D. S., AZEVEDO, J. L. and ARAÚJO, W. L. 2002. **Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico**. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - nº 29**. Disponível em <[www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br)>.

SOUZA, L.A D., MOSCHETA, S.I, MOURÃO, S.M.K and SILVÉRIO A. Morphology and Anatomy of the Flowers of *Trichiliacatigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 383 – 394. 2001.

VALADARES-INGLIS, M. C.; INGLIS, P. W.; QUEIROZ, P. R.; CASTRO, M. E. B. Genética e Biologia molecular de fungos e vírus utilizados no controle biológico. In: MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. **Recursos Genéticos & Melhoramento – Microrganismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 476- 518, 2002.