



POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Trichilia elegans* (MELIACEAE) NO CONTROLEDO FITOPATÓGENO *Alternaria alternata*

*Sandro Augusto Rhoden*¹; *Adriana Garcia*²; *Andressa Domingos Polli*³; *Julio Cesar Polonio*⁴; *João Lucio de Azevedo*⁵; *João Alencar Pamphile*⁶

RESUMO: Microrganismos endofíticos são bactérias ou fungos que colonizam o interior de tecidos ou órgãos vegetais das plantas, sem causar danos ao seu hospedeiro, podendo também manifestar diversas vantagens à planta e produzir substâncias de interesse. *Trichilia elegans* A. Juss., pertencente à família Meliaceae, é uma árvore nativa do Brasil que cresce abundantemente em diversas regiões do país, utilizada tanto na medicina tradicional como também na medicina popular. *Alternaria alternata* é um fungo saprófito causador da chamada “mancha marrom de alternaria” (*Alternaria brown spot*) que acomete diversas culturas cítricas. O objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade antagonística *in vitro* de seis linhagens de bactérias endofíticas isoladas de folhas *T. elegans* com o fungo fitopatógeno *A. alternata*. Para esta análise discos de 6mm do fitopatógeno foram inoculados no centro da placa de Petri, e posteriormente inoculado o endofítico com duas estrias equidistantes ao fitopatógeno. No controle foi inoculado somente o fitopatógeno no centro da placa. O crescimento micelial foi aferido utilizando o programa image J 1.46r, de acordo com a fórmula: $Im\% = 100 - (MT/MC) \times 100$. Os Im's foram: 71,7% (isol. 04), 62,8% (isol. 22), 53,8% (isol. 11), 50,8% (isol. 29), 50,2% (isol. 36) e 35,6% (isol. 28). Os resultados apontam que as linhagens de bactérias endofíticas isoladas de *Trichilia elegans* possuem grande potencial biotecnológico e são altamente promissoras no controle do fitopatógeno *Alternaria alternata*, sendo que estudos são necessários para que futuramente possam ser alternativas ao uso de produtos químicos de controle em culturas de interesse.

PALAVRAS-CHAVE : *Alternaria alternata*; Antagonismo; Bactérias endofíticas; Potencial biotecnológico; *Trichilia elegans*.

1. INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas tem sido e estão sendo realizadas a fim de estudar o potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos, uma vez que estes são bactérias ou fungos

¹Doutorando do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada – Universidade Estadual de Maringá, UEM. Bolsista CAPES. e-mail: sandro_ar@hotmail.com e-mail: sandro_ar@hotmail.com.

² Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada – Universidade Estadual de Maringá, UEM. e-mail: adrianagarcia.biologa@gmail.com

³ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia - Universidade Estadual de Maringá, UEM. e-mail: andressa_polli@hotmail.com

⁴ 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

⁵ Professor Doutor e Pesquisador visitante do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - Universidade Estadual de Maringá, UEM. e-mail: jlazevedo@usp.br

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

que colonizam o interior de tecidos ou órgãos vegetais das plantas, sem causar danos ao seu hospedeiro, e também podem manifestar diversas vantagens à planta e produzir substâncias de interesse (Azevedo et al., 2002; Kaneko et al., 2010).

Os microrganismos endofíticos ou endófitos podem ser utilizados no controle de doenças causadas por bactérias, fungos e nematóides, uma vez que colonizam nichos semelhantes aos ocupados por estes patógenos e que também ativam o sistema de defesa da planta, causando um aumento da resistência (Paz et al., 2007)

A presente investigação do potencial biotecnológico utilizou bactérias endofíticas da planta *Trichilia elegans* A. Juss. que pertencente à família Meliaceae, é uma árvore nativa que cresce abundantemente em diversas regiões do Brasil. Na medicina tradicional são utilizadas preparações da folha, sementes, casca e raízes de muitas plantas da família Meliaceae e algumas plantas do gênero *Trichilia* são utilizadas também na medicina popular (Souza et al., 2001)

Alternaria alternata é um fungo saprófito causador da chamada “mancha marrom de alternaria” (*Alternaria brown spot*) que acomete diversas culturas cítricas, como as tangerinas, trazendo grandes prejuízos econômicos. Nas folhas os sintomas nas folhas são observados na forma de pequenas manchas necróticas, marrons a negras, rodeadas por um halo amarelado, podendo se expandir e atingir as nervuras, e nos frutos estas manchas necróticas podem evoluir para grandes lesões com formação de pústulas (Spósito et al., 2003).

Microrganismos endofíticos que habitam plantas medicinais ou com propriedades terapêuticas tem sido analisados devido aos benefícios provenientes desta interação, inclusive muitas substâncias encontradas em plantas também foram extraídas de endófitos. O objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade antagonística *in vitro* de seis linhagens de bactérias endofíticas isoladas de folhas *T. elegans* com o fungo fitopatógeno *A. alternata*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação da atividade antagonística foram utilizadas seis linhagens de bactérias endofíticas isoladas de folhas de *T. elegans* (Isolados: 04, 11, 22, 28, 29 e 36) e o fitopatógeno *A. alternata*.

As bactérias endofíticas foram previamente repicadas em meio TSB (Trypticase Soy Broth) e mantidas em B.O.D. à 28°C por 24hrs.

Para o teste de antagonismo, um disco de 6mm de diâmetro do fitopatógeno *A. alternata* foi inoculado no centro da placa de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar). Em seguida, foi inoculada a bactéria com duas estrias paralelas, sendo cada uma delas à dois centímetros e meio do fitopatógeno, onde o diâmetro total da placa era 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: $Im\% = 100 - (MT/MC) \times 100$, onde $Im\%$ = 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

A utilização de fungicidas no controle de fitopatógenos, apesar dos bons resultados, apresenta problemas como a alta toxicidade, tanto para o homem quanto para

o ambiente, e a perda do efeito devido à seleção de patógenos resistentes (Liu et al., 2001).

Para o controle da mancha marrom de alternaria, os produtores devem adotar estratégias de manejo e tratamentos com diversos fungicidas, uma vez que seu controle é difícil e a doença pode causar grandes perdas na produção (Spósito et al., 2003).

A capacidade dos endófitos de penetrarem e se disseminarem nas plantas é uma das bases do controle biológico, que é uma medida não-química de controle dos fitopatógenos (Araújo et al., 2002).

Em vista da grande dificuldade do controle de algumas doenças em plantas, como a mancha marrom de alternaria, e dos altos gastos com produtos químicos, o uso de microrganismos endofíticos com ação de biocontrole se mostra como uma alternativa econômica e ecologicamente sustentável para os diversos sistemas de produção (Santos e Varavallo, 2011).

Das seis linhagens de bactérias endofíticas isoladas das folhas de *T. elegans*, todas apresentaram diferentes índices de inibição do fitopatógeno *A. alternata*. Os maiores índices foram do isolado 04, com Im de 71,7%, e do isolado 22, com Im de 62,8% (Figura 1). Os índices de inibição das outras quatro linhagens foram de: 53,8% (isol. 11), 50,8% (isol. 29), 50,2% (isol. 36) e 35,6% (isol. 28).

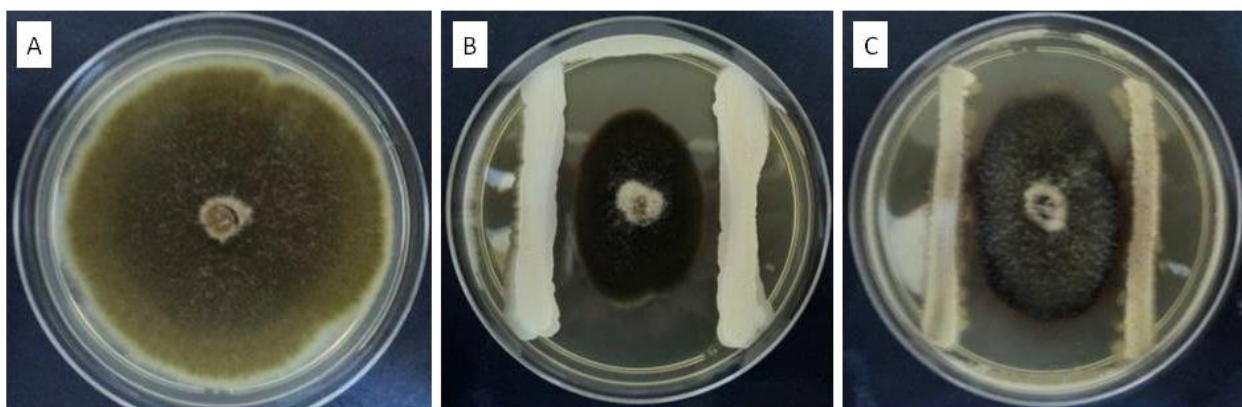


Figura 1: Atividade antagonística de bactérias endofíticas isoladas de *T. elegans* com o fitopatógeno *Alternaria alternata*. (A) Controle somente com o fitopatógeno, (B) linhagem 04 contra o fitopatógeno e (C) linhagem 22 contra o fitopatógeno.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apontam que as linhagens de bactérias endofíticas isoladas de *Trichilia elegans* possuem potencial biotecnológico e são promissoras no controle do fitopatógeno *Alternaria alternata*, sendo que estudos são necessários para que futuramente possam ser alternativas ao uso de produtos químicos de controle em culturas de interesse.

5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A.O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P.T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria**, Caxias do Sul: EDUCS, p. 233-268, 2002.

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.

LIU, C. H.; ZOU, W.X.; LU, H.; TAN, R. X.. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 277-282, 2001.

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

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A.. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul/dez 2011.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, S. I.; MOURÃO, S. M. K.; 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.

SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T. Risco Marrom. Fundo De Defesa Da Citricultura. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, n. 19, abril/maio 2003.