



AVALIAÇÃO DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Eichornia azurea* (Sw.) Kunth COM ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA CONTRA O FITOPATÓGENO *Alternaria alternata*

Tiago Tognolli de Almeida¹; Ravelly Casarotti Orlandelli²; Julio Cesar Polonio³; Mariana⁴ Sanches Santos; João Alencar Pamphile⁵

RESUMO: Fungos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas saudáveis, sem causar-lhes aparente dano. Constituem uma íntima interação mutualística com a planta hospedeira, tornando-a mais resistente a ambientes com estresse e recebendo nutrientes e proteção. Esses fungos possuem diversas aplicações biotecnológicas, como controle biológico de pragas e doenças em plantas e uso na indústria farmacêutica, já que produzem compostos bioativos idênticos ou semelhantes aos produzidos pelos vegetais hospedeiros. 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 endofíticos AZ33, AZ26 e AZ13 provenientes da macrófita aquática *Eichornia azurea* (Sw.) Kunth, demonstraram um índice de antagonismo de 57%, 49% e 38% respectivamente, e todos demonstraram um tipo de interação segundo Badalyan et al. (2002) do tipo A. Estes resultados indicam que estes fungos apresentam potencial biotecnológico para a inibição do fitopatógeno *Alternaria alternata*.

PALAVRAS-CHAVE: Endófitos; Macrófitas; Antagonismo.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos ou endófitos são microrganismos que vivem no interior de tecidos ou órgãos dos vegetais, sendo, portanto conhecidos como endofíticos ou endófitos. 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 algumas vantagens ao hospedeiro, protegendo-o contra o ataque de insetos e moléstias, modificando a fisiologia

¹ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá – Paraná. Bolsista da Capes Tiagotognolli@hotmail.com

² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá – Paraná. Bolsista da Capes ravelycasarotti@gmail.com

³ Acadêmico do Curso de Tecnólogo em Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá – Paraná julioc_polonio@hotmail.com

⁴ Acadêmica do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá – Paraná mari_sanches_s@hotmail.com

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

da planta hospedeira e produzindo de substâncias de interesse biotecnológico (AZEVEDO et al., 2002).

O fungo entomopatogenico *Alternaria alternata* ocorre em muitas plantas e outros substratos, incluindo os gêneros alimentícios e têxteis. habitats preferidos são solos, silagem de milho, madeira podre, composto, ninhos de aves e plantas florestais diversas. Entre as doenças de plantas mais comuns no mundo estão as causadas por fungos do gênero *Alternaria*, que produzem toxinas hospedeiro-específicas responsáveis por lesões necróticas que resultam em queda de folhas, de frutos e seca de ponteiros de maçãs, peras, tomates, tangerinas, entre outros. (LEITE, 1997).

Eichhornia azurea (Sw.) Kunth é uma espécie de macrófita aquática fixa flutuante que pode ocorrer em todos os ambientes no período da cheia (THOMAZ et al., 2003). Serve de alimento para inúmeras espécies, e também como habitat para diversas espécies de peixes, caramujos, larvas bem como ovos de insetos. Também pode ser usada como matéria prima para a confecção de tapetes, cordas e afins, além de possuir propriedades medicinais (SCREMIN-DIAS et al., 1999; POTT; POTT, 2000). Possui uma grande produtividade de biomassa devido a sua eficiência na capacidade de movimentação de nutrientes do sedimento por meio de seu sistema radicular (BARKO; SMART, 1980).

O presente trabalho objetiva avaliar a atividade antagonística de fungos endofíticos isolados de folhas de *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*.

2. METODOLOGIA

Para a obtenção de fungos endofíticos foram coletadas da planície de inundação do alto rio Paraná, mais especificamente na cidade de Porto Rico- Pr UEM/Base Avançada do Nupélia, de 10 a 30 amostras de folhas de *Eichhornia azurea* (Sw.), sadias e sem manchas ou qualquer tipo de lesão. As folhas foram lavadas em água corrente, em seguida, as amostras vegetais foram desinfetadas 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 desinfetadas 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, aleatoriamente, três fungos endofíticos isolados de folhas de *Eichhornia azurea* (Sw.), provenientes da planície de inundação do alto rio Paraná.

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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado endofítico proveniente da macrófita aquática *Eichhornia azurea*, AZ 33 demonstrou um índice de antagonismo frente ao fungo patogênico *A. Alternata* de 57%. Já o isolado AZ 26 apresentou o índice de antagonismo de 49% e o isolado AZ 13 38%. Em relação ao tipo de interação competitiva observada entre os endófitos e o patógeno, pode ser observada em todos os casos a interação do tipo A, “deadlock” com 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. Em estudos anteriores utilizando a mesma metodologia Orlandelli (2012) utilizando endófitos provenientes da planta medicinal *Piper hispidum* demonstrou índices de antagonismo de até 65%, índice muito maior que o demonstrado pelos fungicidas controle que foi de 12,16%. Desta forma os resultados de antagonismo mostram esses três isolados promissores controladores biológicos, sendo o isolado AZ33 o melhor deles.

Tabela-I: Índice de antagonismo e tipo de interação dos isolados endofíticos com o fitopatógeno *A. Alternata*.

Isolado	Índice de antagonismo	Tipo de interação
AZ 33	57%	A
AZ 26	49%	A
AZ 13	38%	A

Fonte: Autores

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam que os fungos endofíticos isolados da macrófita aquática *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth possuem potencial biotecnológico no controle do fitopatógeno *A. Alternata*, porém futuros estudos envolvendo extratos de metabólitos e aplicação sobre cultura do fitopatógeno ainda são necessários para determinar a forma de sua utilização.

5. 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.

BADALYAN SM, INNOCENTI G, GARIBYAN NG Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathol Mediterr** 41:200–225, (2002).

BARKO, J.W. & SMART, R.M. Mobilization of sediment P by submerged freshwater macrophytes. **Freshwat. Biology**. v.10: 229-38, 1980.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N.; Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta test. **European Journal of Plant Pathology**, v.117: 237-246, 2007.

LEITE, R.M.V.B.C. Doenças do girassol. Londrina: EMBRAPA-CNPSo,1997. 68p.
(**EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica**, 19). ISSN: 0100-6703

ORLANDELL,R.C.; ALBERTO,R.N.; RUBIN FILHO, C.J.; PAMPHILE, J.A. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. **Genetics Molecular Research**. v 11 (2): p.1575-1585. 2012.

POTT VJ & POTT A (2000) **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília, Embrapa: Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal.

SCREMIN-DIAS E, POTT VJ, HORA RC & SOUZA PR (1999). **Nos jardins submersos da Bodoquena**. Campo Grande: Editora UFMS.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. 2003. **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. Maringá: EDUEM, iv, cap. 6. p. 145-162.