

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA *IN VITRO* DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Mikania glomerata* SPRENG. (ASTERACEA)
COM O FITOPATÓGENO *Alternaria alternata***

**Julio Cesar Polonio
Aline Almeida de Oliveira
Julia Rosa Moreira
Tiago Tognolli Almeida
Adriana Garcia
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Biotecnologia Microbiana. Av. Colombo, n. 5790, Maringá (PR), CEP: 87020-900. e-mail: prof.pamphile@gmail.com

Introdução

Microrganismos endofíticos são geralmente fungos e bactérias que colonizam o interior das plantas sem lhes causar danos, e podendo possuir uma relação benéfica com elas, oferecendo resistência a insetos pragas e doenças, além da produção de substâncias de interesse biotecnológico (Esposito e azevedo, 2010). *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae), popular “guaco”, é uma planta medicinal utilizada popularmente em casos de asma, bronquite e como adjuvante à tosse (Ruppelt et al., 1991). Plantas medicinais representam um considerável reservatório de microrganismos com potencial para descobertas de novas moléculas bioativas (Peixoto-Neto et al., 2004).

Espécies fitopatogênicas do gênero *Alternaria* causam um grande espectro de doenças em diversas plantas agronomicamente importantes, incluindo ornamentais, oleaginosas, cereais, crucíferas, tubérculos, e frutos como tomate, citros e maçã. A espécie *A. alternata* se destaca por possuir sete variantes patogênicas, referidas como patótipos ou *formae speciales*, as quais produzem toxinas responsáveis por causar doenças em hospedeiros determinados (Thomma et al., 2003).

O objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade antagonista, *in vitro*, de fungos endofíticos isolados de folhas de *M. glomerata* com o fitopatógeno *A. alternata*.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas 15 linhagens de fungos endofíticos isolados de folhas de *M. glomerata*. A técnica de Cultura Pareada foi realizada pela inoculação de discos de 6 mm de diâmetro de colônias crescidas à 28°C, durante 7 dias, do fungo endofítico e do fitopatógeno, em polos opostos da placa de Petri (4 cm de distância) contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Os testes foram realizados em triplicata. Para o controle negativo, foi inoculado somente o fitopatógeno em um polo da placa. As interações competitivas foram analisadas segundo a escala de Badalyan et al. (2002) e o crescimento do fitopatógeno foi medido utilizando o *software* ImageJ 1.46r. Para o índice de inibição foi realizado o cálculo: $Im\% = 100 - (MT/MC) \times 100$, 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 do controle, em cm^2 .

Resultados

As análises revelaram que todos os isolados avaliados apresentaram inibição do fitopatógeno avaliado, mas em diferentes porcentagens (Tabela 1), porém a linhagem endofítica G-58 foi a que apresentou maior índice de inibição (Figura 1).

Com relação aos tipos de interações, 13 isolados apresentaram interação do tipo A (“deadlock”, com contato micelial) e dois apresentaram interações do tipo B (“deadlock”, a distância) e CA1 (crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógenos após “deadlock” inicial com contato) de acordo com a escala de Badalyan et al. (2006). Esses resultados demonstram que estes fungos endofíticos, isolados de *M. glomerata*, apresentam potencial para futuros estudos no controle biológico.

Conclusão

Os fungos endofíticos isolados de *M. glomerata* apresentaram resultados promissores no controle biológico do fitopatógeno *A. alternata*, mas ainda são necessários estudos sobre o seu potencial biotecnológico e possíveis formas de aplicação.

Tabela 1: Teste de antagonismo das linhagens endofíticas isoladas de *Mikania glomerata* contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*.

Linhagens	Média do crescimento micelial (cm ²)	Im%	Tipo de interação
Controle	34,371		
G-76	30,299	11,85%	A
G-60	26,710	22,29%	A
G-78	33,989	1,11%	A
G-58	17,296	49,68%	CA1
G-67	23,945	30,33%	A
G-56	27,799	19,12%	A
G-72	24,873	27,63%	A
G-49	32,226	6,24%	A
G-73	25,549	25,67%	A
G-75	33,644	2,11%	A
G-47	28,847	16,07%	A
G-53	27,305	20,56%	A
G-52	30,089	12,46%	A
G-43	24,973	27,34%	B
G-41	32,526	5,37%	A

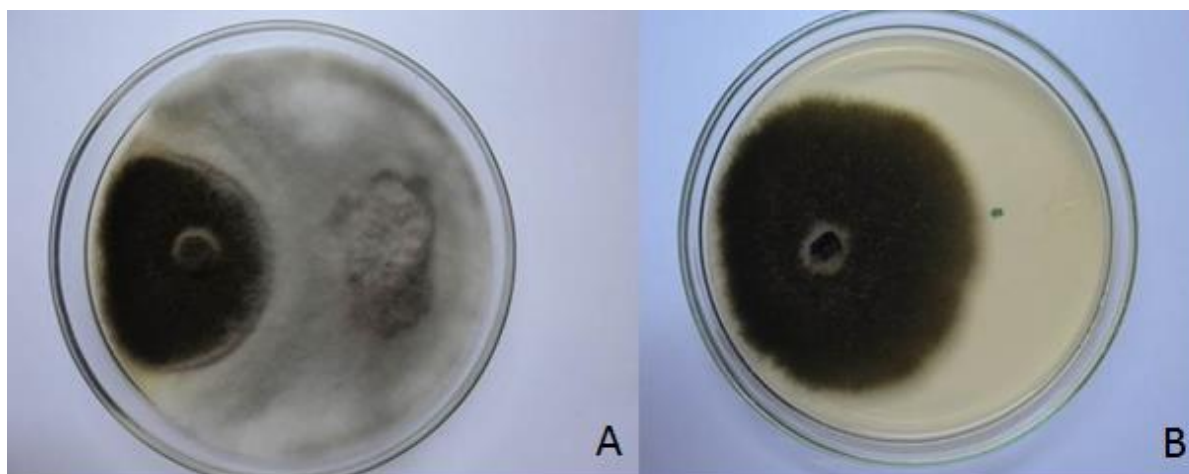


Figura 1: Teste de antagonismo de isolados endofíticos de *Mikania glomerata* contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*. Isolado G-58 à direita e fitopatógeno à esquerda (A) e Controle (B).

Referências Bibliográficas

BADALYAN, S. M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathol Mediterr.*, v. 41, p. 200-225, 2002.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul: EDUCS; 2010. p.535-556.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, J. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromát.*, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N.A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. Analgesic and anti-inflammatory activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 203-205, 1991.

THOMMA, B. P. H. J. *Alternaria* spp. from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.*, v. 4, n. 4, p. 225-236, 2003.



Resumo expandido apresentado no
XIV Encontro Maringaense de Biologia e XXVII Semana de Biologia
05 a 09 de agosto de 2013
Maringá (PR).

**TESTE DE ANTAGONISMO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
Mikania glomerata SPRENG. (ASTERACEAE) SOBRE O
FITOPATÓGENO *Didymella bryoniae***

**Julio Cesar Polonio
Andressa Domingos Polli
Tiago Tognolli Almeida
Adriana Garcia
João Lúcio de Azevedo
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Biotecnologia Microbiana. Av. Colombo, n. 5790, Maringá (PR), CEP: 87020-900. e-mail: prof.pamphile@gmail.com

Introdução

Microrganismos endofíticos são geralmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas sem lhes causar danos. Em condições ambientais adequadas vivem em equilíbrio com a planta, podendo colonizar o mesmo nicho dos fitopatógenos e assim, proporcionar proteção para a planta (Espósito e Azevedo, 2010). A *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) é uma planta medicinal conhecida como “guaco”, utilizada popularmente em casos de asma, bronquite e como adjuvante à tosse (Ruppelt et al., 1991). Muitas plantas medicinais representam um considerável reservatório de microrganismos com potencial para descobertas de novas moléculas bioativas (Peixoto-Neto et al., 2004).

O fitopatógeno *Didymella bryoniae* causa o crestamento gomoso do caule, sendo uma das mais importantes doenças da melancia (*Citrullus lanatus*). O controle de doenças causadas por fitopatógenos é dificultado devido à complexidade do ambiente, na qual o controle químico tem sua eficiência prejudicada, além de ser prejudicial à microbiota benéfica e deixar resíduos no ambiente (Santos et al., 2006).

O objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade antagonística, *in vitro*, de fungos endofíticos isolados de folhas de *M. glomerata* com o fitopatógeno *D. bryoniae*.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas 40 linhagens de fungos endofíticos isolados de folhas de *M. glomerata*. A técnica de Cultura Pareada foi realizada pela inoculação dos discos de 6 mm de diâmetro de colônias crescidas à 28°C, por 7 dias, do fungo endofítico e do fitopatógeno em polos opostos das placas de Petri de 9 cm, contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sendo que a distância entre os fungos foi de 4 cm. Os testes foram realizados em triplicata. O controle negativo foi realizado pela inoculação do fitopatógeno em ambos os polos da placa, em triplicata. As interações competitivas foram analisadas segundo a escala de Badalyan et al. (2002) e o crescimento do fitopatógeno foi medido utilizando o *software* ImageJ 1.46r.

Resultados

Dos isolados avaliados, os que apresentaram melhores resultados de inibição, em comparação ao controle, foram os isolados G-01, com 67,58% de inibição, o G-02 com 68,38% e o G-03 com 62,16%. Todos os três apresentaram interação do tipo A, “deadlock” com contato micelial (Figura 1). O controle teve uma média de crescimento micelial de 11,4 cm².

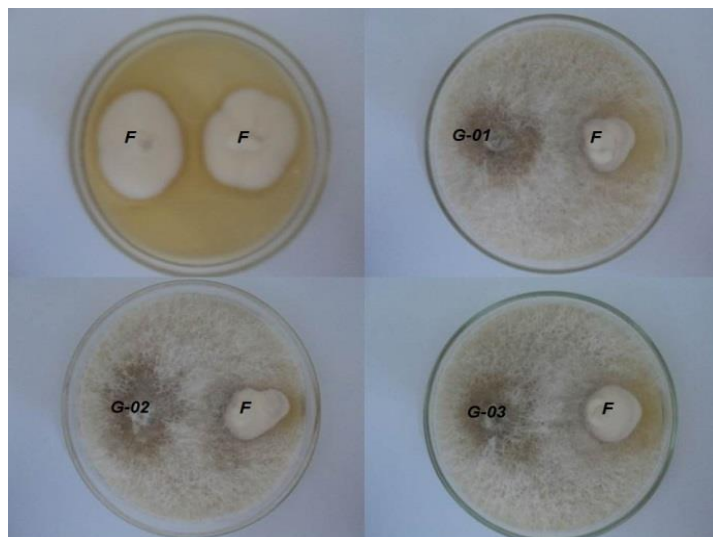


Figura 1: Teste de Antagonismo de isolados endofíticos de *Mikania glomerata* contra o fitopatógeno *Didymella bryoniae*; F: Fitopatógeno; G-01, G-02 e G-03: isolados endofíticos.

Conclusão

Os fungos endofíticos isolados de *M. glomerata* apresentaram resultados promissores no controle do fitopatógeno *Didymella bryoniae*. Entretanto, futuros estudos ainda são necessários para evidenciar o real potencial no controle deste fitopatógeno e uma possível forma de aplicação.

Referências Bibliográficas

- BADALYAN, S. M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathol Mediterr.**, v. 41, p. 200-225, 2002.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul: EDUCS. 2010. p. 535-556.
- PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, J. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat.**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.
- RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N.A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. Analgesic and anti-inflammatory activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 203-205, 1991.
- SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; REIS, A. Resistencia de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. **Fitopatol. Bras.**, v. 31, p. 476-482, 2006.



Resumo expandido apresentado no
XIV Encontro Maringaense de Biologia e XXVII Semana de Biologia
05 a 09 de agosto de 2013
Maringá (PR).

ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Mikania glomerata* SPRENG. (ASTERACEAE)

Laise Nayana Sala Elpidio
Lígia Maria Crubelati Bulla
Afonso Carrasco Pepineli
Adriana Garcia
Tiago Tognolli Almeida
João Alencar Pamphile

Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Biotecnologia Microbiana. Av. Colombo, nº 5790, Maringá (PR), CEP: 87020-900. e-mail: prof.pamphile@gmail.com

Introdução

Microrganismos endofíticos, ou endófitos, são definidos como àqueles que habitam o interior das plantas, sem aparentemente causar qualquer efeito negativo aos seus hospedeiros. De acordo com seu crescimento em meio de cultura, são classificados em cultiváveis ou não cultiváveis (Lacava et al., 2010). Para Azevedo (1998), de maneira geral, os endofíticos se aderem à planta por aberturas naturais, como estômatos e ferimentos. Após a penetração, os fungos se disseminam de maneira sistêmica, para diversas partes da planta, podendo habitar de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e ainda em alguns casos ocorre colonização intracelular.

Os endófitos são de extrema importância biotecnológica, devido à ampla fonte de produtos, sendo úteis na agricultura e na indústria, principalmente na alimentícia e farmacêutica, também podem ser utilizados como vetores para a introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos, além de apresentarem ampla aplicação como antibióticos, antiparasitários, antifúngicos, antitumorais, entre outras aplicações (Lacava et al., 2010).

Plantas medicinais tem sido alvo de isolamento, caracterização e análise da diversidade de fungos endofíticos, pois representam um considerável reservatório de endofíticos com potencial para descobertas de novas moléculas bioativas (Peixoto-Neto et al., 2004). Desta forma, estudar a composição da microbiota endofítica da planta *Mikania glomerata* Spreng. (família Asteraceae), conhecida popularmente pelo nome de Guaco e utilizada popularmente nos casos de asma, bronquite e como adjuvante no combate à tosse, atividade anti-alérgica e antimicrobiana, além de atividade analgésica, torna-se uma fonte alternativa na busca destes compostos (Rocha et al., 2008; Gasparetto et al., 2010).

Nesse estudo, o objetivo foi realizar o isolamento de fungos endofíticos de *M. glomerata*.

Material de Métodos

Para esse estudo foram utilizadas folhas saudáveis de *M. glomerata*, coletadas no Horto Didático da Universidade Estadual de Maringá, Paraná. Inicialmente as folhas foram lavadas em água corrente, e a seguir em solução de Tween 80 a 0,1%; imersas em etanol 70%, durante um minuto; em solução de hipoclorito 5%, mantidas sob agitação por três minutos,

novamente imersas em etanol 70% por mais trinta segundos e enxaguadas duas vezes em água destilada autoclavada. Posteriormente as folhas foram cortadas em fluxo laminar em pequenos fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² e inseridos cinco fragmentos foliares em cada placa de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com tetraciclina totalizando 500 fragmentos, em seguida as placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 28°C por aproximadamente 7 dias. Para o controle negativo uma alíquota de 100 µL da água do enxágue final das folhas foram semeados em placa contendo meio BDA e incubados nas mesmas condições das amostras. Após este período os fungos obtidos foram transferidos para placas contendo meio BDA, e posteriormente purificados. A frequência de isolamento foi realizada através da avaliação do número de fragmentos que apresentaram crescimento microbiano em relação ao número total de fragmentos vegetais avaliados.

Resultados

Do total de 500 fragmentos foliares foram isolados aleatoriamente 80 fungos endofíticos, buscando-se a maior diversidade possível. A frequência de isolamento (FI) foi de 100%, em incubação com hipoclorito de sódio 5% por 3 minutos. Garcia et al., (2012) também obtiveram uma frequência de isolamento de 100%, no isolamento de fungos endofíticos de folhas de *Sapindus saponaria* (Sapindaceae).

Observou-se que nas placas de Petri contendo o inóculo da água de lavagem, após a desinfecção das folhas (controle negativo), houve ausência total de crescimento. Este resultado indica que a desinfecção superficial foi efetiva, impedindo o crescimento de microrganismos epifíticos e comprovando que os microrganismos obtidos são realmente endofíticos.

Conclusão

Foi possível isolar 80 fungos endofíticos das folhas de *M. glomerata* (Guaco), sendo essa uma fonte de microrganismos endofíticos que serão estudados como provável fonte de novos compostos bioativos.

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, W. L. et al. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ. 2010. p. 167.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Ecologia Microbiana**, v. 1. 1 ed. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA. 1998. p. 117-137.

GARCIA, A.; RHODEN, S. A.; RUBIN-FILHO, C. J.; NAKAMURA, C.V.; PAMPHILE, J. A. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. **Biol. Research**, v. 45, p. 139-148, 2012.

GASPARETTO, J. C.; CAMPOS, F. R.; BUDEL, J. M.; PONTAROLO, R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Rev. Bras. farmacogn.**, v. 20, n. 4, 2010.

LACAVA, P.T.; SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.).

Fungos: Biologia, Bioquímica e biotecnologia. 2 ed. Caxias do Sul: Editora da universidade de Caxias do Sul. 2010.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, J. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromát.**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

ROCHA, L.; LUCIO, E. M. A.; FRANÇA, H. S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Rev. Bras. Farmacog.**, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18s0/a19v18s0.pdf>



Resumo expandido apresentado no
XIV Encontro Maringaense de Biologia e XXVII Semana de Biologia
05 a 09 de agosto de 2013
Maringá (PR).

MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS NO LABORATÓRIO DE PESQUISA EM MICOLOGIA MÉDICA DA UEM PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DE INTERESSE MÉDICO

**Waylla Albuquerque de Jesus
Adriana Fiorini
Eliane Martins da Silva Bettega
Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**

Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina,
Laboratório de Micologia Médica, LEPAC. Av. Colombo, n. 5790, Maringá (PR),
CEP: 87020-900. e-mail: w.albuquerque11@gmail.com

Introdução

Leveduras do gênero *Candida* têm sido frequentemente relatadas como agentes de fungemia, e a identificação das mesmas é indispensável para reconhecimento de surtos de infecção, detecção de transmissão cruzada, entre outras importâncias epidemiológicas. Devido às dificuldades que podem ser encontradas na identificação de algumas espécies, através de métodos clássicos de identificação, métodos moleculares têm sido aplicados para tanto. Exemplos incluem as técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento, e espectrometria de massa (MALDI-Tof) (Cordoba et al., 2011). A técnica de PCR-RFLP permite análise das variações de tamanho de fragmentos de DNA gerados por digestão com endonucleases de restrição, gerando um “fingerprint” genético para cada espécie. O sequenciamento de DNA permite a identificação da espécie com base nos polimorfismos de sequência, e a análise por MALDI-Tof, permite a identificação de leveduras com base nas proteínas da parede celular (Storti et al., 2012). Este estudo teve como objetivo demonstrar os métodos moleculares utilizados no Laboratório de Micologia Médica da UEM, como complementares na identificação convencional de leveduras, tanto na rotina como na pesquisa.

Materiais e Métodos

Microorganismos

Os isolados corresponderam às leveduras oriundas de diversas fontes, como hemocultura, secreção vaginal, cavidade oral, superfícies hospitalares e mãos de profissionais de saúde, no período de 2010-2012. As leveduras foram inicialmente triadas por meio cromogênico, avaliação micromorfológica e métodos clássicos de identificação.

PCR-RFLP

Para a identificação de até seis espécies mais frequentes do gênero *Candida*, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP, segundo o protocolo descrito por Mirhendi et al. (2006). A região ITS-1-4 foi amplificada por PCR e os amplicons, clivados com a enzima de restrição *MspI*. Para a identificação do complexo *C. parapsilosis* foi seguido o protocolo descrito por Tavanti et al. (2005). A região SADH foi amplificada e clivada com a enzima de restrição *BanI*. A PCR-RFLP com a enzima *AvrII* foi utilizada para discriminação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*. A análise foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X.

Sequenciamento de ácidos nucléicos

A região ITS1-4 foi seqüenciada utilizando o kit BigDye da Applied Biosystems em seqüenciador Applied Biosystems® Genetic Analyzer 3500xL da Life Technologies. O alinhamento das seqüências foi realizado a plataforma BLASTn do NCBI.

MALDI-Tof

As proteínas de parede celular das leveduras foram extraídas pelo método descrito por Spanu et al. (2012). As proteínas extraídas foram fixadas em matriz para MALDI e analisadas por espectrômetro de massa MALDI-Tof Microflex System (Bruke Daltonics).

Resultados

PCR-RFLP

A técnica de PCR-RFLP (ITS1-4-*Msp*I) permitiu a identificação de grande número de leveduras interesse médico, sendo as principais *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* (*lato sensu*), *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Com a técnica de PCR-RFLP (SADH-*Ban*I) foi possível identificar somente *C. parapsilosis*. Tanto *C. metapsilosis* quanto *C. orthopsilosis* não foram encontradas. A técnica de PCR-RFLP (ITS1-4-*Avr*II) permitiu confirmar a presença de *C. dubliniensis* em algumas amostras clínicas.

Sequenciamento de ácidos nucléicos

Foi possível identificar leveduras pouco frequentes em amostras clínicas e de difícil identificação por métodos convencionais, como *C. pararugosa*, *C. famata* e *C. lipolytica*.

MALDI-Tof

Esta análise permitiu confirmar a identificação realizada pela técnica PCR-RFLP, identificar outras leveduras do gênero *Candida*, tais como *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. pararugosa*, *C. zeylanoides* e *C. orthopsilosis*, além de identificar fungos, tais como *Trichosporon asahii* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

Conclusão

As técnicas acima descritas foram utilizadas de forma independente, por diferentes pesquisadores. Observou-se que essas técnicas foram necessárias tanto para a identificação de isolados de difícil caracterização como para reduzir o tempo necessário para a identificação de espécies mais frequentes.

Referências Bibliográficas

CORDOBA, S. et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 43, p. 176-185, 2011.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; KHORAMIZADEH, M.; YAMAGUCHI, H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida*. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 47, p.225-229, 2006.

SPANU, T. et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p.176-179, 2012.

STORTI, L. R.; PASQUALE, G.; SCOMPARIM, R.; GALASTRI, A. L.; ALTERTHUM, F.; GAMBALE, W. et al. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiai Medical College, State of Sao Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 5, p. 225-231, 2012.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J. Clin. Microbiol.**, v. 3, p. 284-292, 2005.



Resumo expandido apresentado no
XIV Encontro Maringaense de Biologia e XXVII Semana de Biologia
05 a 09 de agosto de 2013
Maringá (PR).

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE *Sapindus saponaria* L. COM O FITOPATÓGENO *Fusarium solani*

Andressa Domingos Polli
Adriana Garcia
Caroline Menicoze dos Santos
Sandro Augusto Rhoden
João Lúcio de Azevedo
João Alencar Pamphile

Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Biotecnologia Microbiana. Av. Colombo, n. 5790, Maringá (PR), CEP: 87020-900. e-mail: andressa_polli@hotmail.com

Introdução

Microrganismos endofíticos, ou endófitos, são bactérias ou fungos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar lhes danos, e vivendo em equilíbrio químico com tais plantas (Azevedo 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).

Bactérias e fungos endofíticos de plantas medicinais ou com propriedades terapêuticas estão sendo cada vez mais estudados a partir de pressupostos de que sua interação com a planta produza novas substâncias bioativas. *Sapindus saponaria* L. é uma árvore da família Sapindaceae, conhecida popularmente como “sabão-de-soldado” e utilizada na medicina popular, pois todas as suas partes apresentam atividades terapêuticas diversas, incluindo a ação antimicrobiana e larvicida (Albiero et al., 2001; Lorenzi, 2004).

O gênero *Fusarium* compreende um grupo grande e heterogêneo de fungos que provoca doenças em diversas plantas, tais como a soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*), reduzindo tanto a qualidade como a quantidade dos seus produtos, sendo portanto economicamente prejudicial (Matarese et al., 2012). O objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade antagonística de bactérias endofíticas isoladas de folhas de *S. saponaria* contra o fitopatógeno *F. solani*.

Materiais e Métodos

Para a avaliação da atividade antagonística foram utilizadas cinco linhagens de bactérias endofíticas isoladas de folhas de *S. saponaria* (isolados 55, 58, 62, 67 e 84) e o fitopatógeno *F. solani*. 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. No interior da placa foram realizadas duas estrias paralelas de bactérias endofíticas, em cada lado do fitopatógeno, a uma distância de dois centímetros da borda, sendo o diâmetro total da placa de 9 cm. Para tratamento controle foi inoculado somente o fitopatógeno 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, pela aferição de área do crescimento fitopatógeno após 7 dias (para aferição foi considerada a borda 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 .

Resultados

Em relação às bactérias endofíticas isoladas das folhas de *S. saponaria*, os índices de antagonismo (Im) foram de: 19,9% (isol. 55), 13,2% (isol. 58), 13,7% (isol. 62), 24,4% (isol. 67) e 13% (isol. 84). Estes estudos iniciais demonstram que, das bactérias endofíticas avaliadas, o isolado 67 (Figura 1), apresentou o maior índice de inibição, sugerindo assim que esses isolados podem ser promissores no controle de *F. solani*.

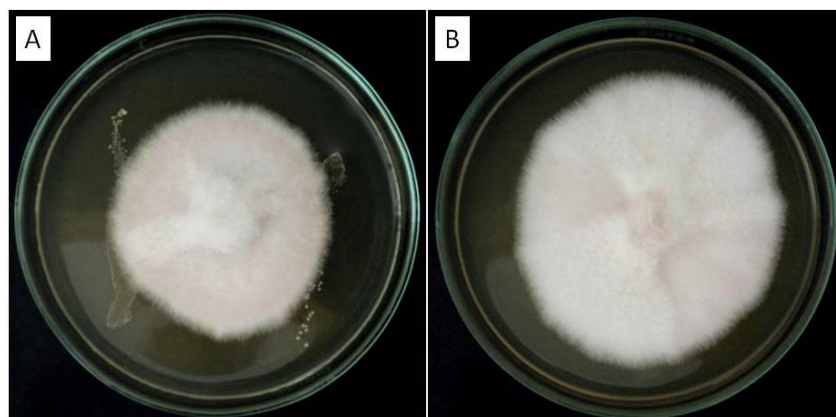


Figura 1: Atividade antagonística da bactéria endofítica (67) isolada de *S. saponaria* contra o fitopatógeno *F. solani* (A); controle somente com o fitopatógeno (B).

Conclusão

A análise dos resultados mostra que as bactérias endofíticas isoladas de *S. saponaria* foram promissoras, com diferentes porcentagens, na inibição do fitopatógeno *F. solani*. Porém, maiores estudos são necessários para avaliar o real potencial de controle biológico destas bactérias contra este fitopatógeno.

Referências Bibliográficas

- ALBIERO, A. L. M.; BACCHI, E. M.; MOURÃO, K. S.M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 549-560, 2001.
- 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. 2002, p. 233-268.
- KANEKO, T. et al. Complete genomic structure of the cultivate drice endophyte *Azospirillum* sp. B510. **DNA Research**, v. 17, n. 1, p. 37-50, 2010.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. 4ed. São Paulo: Editora Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2004.

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.

MATARESE, F.; SARROCCO, S.; GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; VANNACCI, G. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. **Microbiology**, v. 158, p. 98–106, 2012.

PAZ, Z.; BURDMAN, S.; GERSON, U.; SZTEJNBERG, A. Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 2570-2579, 2007.



Resumo expandido apresentado no
XIV Encontro Maringaense de Biologia e XXVII Semana de Biologia
05 a 09 de agosto de 2013
Maringá (PR).

**TESTE DE ANTAGONISMO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS *Phoma* sp. E
Alternaria sp. ISOLADOS DE FOLHAS DE *Sapindus saponaria* L.
COM O FITOPATÓGENO *Sclerotinia sclerotiorum***

**Andressa Domingos Polli
Adriana Garcia
Caroline Menicoze dos Santos
Sandro Augusto Rhoden
Julio Cesar Polonio
João Alencar Pamphile**

Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Laboratório de Biotecnologia Microbiana. Av. Colombo, n. 5790, Maringá (PR), CEP: 87020-900. e-mail: andressa_polli@hotmail.com

Introdução

Endófitos ou endofíticos são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais. São fungos e bactérias que colonizam plantas sem causar-lhes danos, vivendo em equilíbrio no interior das mesmas (Azevedo et al., 2002). Durante o processo de colonização, o endófito pode ativar o sistema de defesa da planta, causando aumento da resistência desta contra fitopatógenos devido à competição por nutrientes e produção de substâncias antimicrobianas (Paz et al., 2007).

Sapindus saponaria L. é uma árvore da família Sapindaceae, conhecida popularmente como “sabão-de-soldado”. Esta árvore é conhecida por sua utilização na medicina popular, sendo que todas as suas partes apresentam atividades terapêuticas diversas, incluindo a ação antimicrobiana e larvicida (Albiero et al., 2001; Lorenzi, 2004).

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, um ascomiceto filamentosos, tem ação necrotrófica, com capacidade de infectar mais de 450 espécies e subespécies de plantas, incluindo muitas culturas de importância econômica, sendo o seu controle difícil e oneroso (Chitrampalam et al., 2013; Zhu et al., 2013).

O objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade antagonística dos fungos endofíticos *Phoma* sp. e *Alternaria* sp., isolados de folhas de *S. saponaria*, contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

Materiais e Métodos

Foram utilizados duas linhagens de fungos endofíticos: *Phoma* sp. e *Alternaria* sp., isolados da planta *S. saponaria* e idenficadas por Garcia et al. (2012). A técnica realizada para determinar o antagonismo foi a de Cultura Pareada, na qual são inoculados discos de 6 mm de diâmetro de colônias crescidas a 28°C, durante 7 dias, tanto do fungo endofítico quanto do fitopatógeno em polos opostos de placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). A distância entre os fungos foi de 2 cm da borda da placa, sendo o diâmetro total da placa de 9 cm. Para o controle negativo, o fitopatógeno foi inoculado em apenas um dos polos da placa de Petri. 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 crescimento fitopatógeno após 7 dias (para aferição foi considerada a borda 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 .

Resultados

Verificou-se que, no teste *in vitro* realizado, não houve resultado significativo pois não ocorreu a inibição do fitopatógeno *S. sclerotiorum* pelos dois fungos endofíticos avaliados (Figura 1). Estudos utilizando endófitos no controle de *S. sclerotinum* são promissores, devido à dificuldade do controle deste fitopatógeno, que pode infectar mais de 450 espécies de plantas, muitas de interesse econômico. Porém outras metodologias devem ser avaliadas para utilização destes endófitos no controle biológico.



Figura 1: Teste de antagonismo dos fungos endofíticos isolados de folhas de *S. saponaria*, na inibição do crescimento do fitopatógeno *S. sclerotiorum*. *S. sclerotiorum* (esquerda) contra linhagem *Phoma* sp. (A); *S. sclerotiorum* (esquerda) contra linhagem *Alternaria* sp. (B) e controle somente com o fitopatógeno (C).

Conclusão

Maiores estudos e outras metodologias são necessárias para avaliar a atividade dos fungos endofíticos *Phoma* sp. e *Alternaria* sp. no controle do fitopatógeno *S. sclerotiorum* e também a ação destes, contra outros fitopatógenos de interesse econômico.

Referências Bibliográficas

- ALBIERO, A. L. M.; BACCHI, E. M.; MOURÃO, K. S.M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 549-560, 2001.
- 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. 2002, p. 233-268.
- CHITRAMPALAM, P.; INDERBITZIN, P.; MARUTHACHALAM, K.; WU, B-M.; SUBBARAO, K. V. The *Sclerotinia sclerotiorum* Mating Type Locus (MAT) contains a 3.6-kb region that is inverted in every meiotic generation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, e56895, 2013.

GARCIA, A.; RHODEN, S. A.; RUBIN-FILHO, C. J.; NAKAMURA, C.V.; PAMPHILE, J. A. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. **Biol. Research**, v. 45, p. 139-148, 2012.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. 4ed. São Paulo: Editora Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2004.

PAZ, Z.; BURDMAN, S.; GERSON, U.; SZTEJNBERG, A. Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 2570-2579, 2007.

ZHU, W.; WEI, W.; FU, Y.; CHENG, J.; XIE, J.; LI, G.; YI, X.; KANG, Z.; DICKMAN, M. B.; JIANG, D. A secretory protein of necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* that suppresses host resistance. **PloS ONE**, v. 8, n. 1, e53901, 2013.



Resumo expandido apresentado no
XIV Encontro Maringaense de Biologia e XXVII Semana de Biologia
05 a 09 de agosto de 2013
Maringá (PR).