

PROSPECÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ENDÓFITOS DO GÊNERO *Diaporthe* sp. ASSOCIADOS À *Pachystachys lutea* NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*

Ana Paula Ferreira (PIBIC/FA), Natieli Jenifer Mateus (PIC/ UEM) João Arthur dos Santos de Oliveira (UEM), João Alencar Pamphile (Orientador), e-mail: japamphile@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Multidisciplinar/Biotecnologia

Palavras-chave: Antagonismo, endófitos, controle biológico.

Resumo:

Micro-organismos endofíticos são fungos e bactérias que vivem no interior das plantas sem causar qualquer dano a seus hospedeiros. Eles sintetizam uma vasta gama de enzimas e produtos naturais com uma variedade de atividades biológicas, tal como, antifúngicos, antibióticos e antitumorais. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um dos patógenos mais prejudiciais em todo o mundo, ocasionando grandes perdas de produtividade agrícola. O objetivo deste trabalho foi realizar prospecção biotecnológica de endófitos do gênero *Diaporthe* sp. isolados de *Pachystachys lutea* no controle de *S. sclerotiorum* isolada no Paraná. O antagonismo *in vitro* foi realizado por meio da técnica de cultura pareada. As linhagens de fungos endofíticos apresentaram diferentes taxas de inibição contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*, variando de 22,1 a 59,5%. Observou-se que 87,5% inibiram o crescimento do fitopatógeno mediante o bloqueio micelial com contato e 12,5% bloquearam à distância. Neste sentido, é de suma importância os estudos que visam à seleção de micro-organismos, notadamente os endófitos, que possam ser empregados no campo como agentes de controle biológico de fitopatógenos.

Introdução

As plantas servem de abrigo a inúmeros micro-organismos que habitam externa e internamente os tecidos vegetais. Dentre esses, destacam-se os micro-organismos endofíticos, que são fungos e bactérias, que vivem no interior das plantas sem causar qualquer dano a seus hospedeiros. Estes endófitos podem aumentar a resistência das plantas contra estresses bióticos e abióticos, produzir hormônios de crescimento, enzimas ou outros compostos de interesse biotecnológico (AZEVEDO, 2014).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é considerado um dos patógenos fúngicos mais prejudiciais em todo o mundo, ocasionando grandes perdas de

produtividade agrícola. Está disseminado em todas as regiões produtoras, sejam elas de clima temperado, tropical ou subtropical (LEITE, et al., 2000). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a prospecção biotecnológica de endófitos do gênero *Diaporthe* sp. isolados de *Pachystachys lutea* no controle de *S. sclerotiorum* isolada no Paraná.

Materiais e métodos

Este teste foi realizado por meio da técnica de cultura pareada (CAMPANILE et al., 2007) com ligeiras modificações. Discos de 5 mm de diâmetro de colônias dos endófitos e fitopatógeno, foram inoculados em polos opostos de placas de Petri, contendo meio BDA, à distância de 4 cm, e incubadas à 28°C por 7 dias. Os testes foram realizados em quintuplicata, assim como o controle empregando apenas o fitopatógeno e controle fitopatógeno contra o fungicida Benlate [50 mg.mL⁻¹]. O índice de inibição (Im%) foi avaliado utilizando o software ImageJ (v 1.46r), aferindo área do crescimento micelial do fitopatógeno, comparando com a área do controle, de acordo com a fórmula: $Im\% = 100 \times (1 - MT/MC)$, onde Im%= Índice de inibição do crescimento micelial em porcentagem, MT=Média da área da quintuplicata aferida para o tratamento em cm², e MC= Média da área da quintuplicata aferida para o controle em cm². As interações competitivas entre endófitos e fitopatógeno foram analisadas de acordo com três tipos de interações descritas por Badalyan et al. (2002). Todos os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância empregando o teste de Scott Knott com $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

As linhagens de fungos endofíticos apresentaram diferentes taxas de inibição (Im%) contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* como apresentado na Tabela 1, variando de 22,1 a 59,5%. Utilizando a escala de Badalyan et al. (2002), observou-se que 87,5% apresentaram interação tipo A na qual os endófitos inibiram o crescimento do fitopatógeno mediante o bloqueio micelial com contato e, 12,5% bloquearam à distância, sendo esta classificada como tipo B (Tabela 1, Figura 1).

O biocontrole *in vitro* de fungos endofíticos contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum* também é relatado em outros trabalhos, como a pesquisa de Rocha et al. (2009) utilizando isolados endofíticos de *Symphytum officinale*. Esses autores obtiveram índices de inibição de até 50% como resultado do teste de antagonismo entre os endófitos de *S. officinale* e fitopatógeno, assim, os dados obtidos reforçaram a capacidade de endófitos inibirem o crescimento de fitopatógenos.

Tabela 1- Avaliação *in vitro* da capacidade antagonística e suas interações, das linhagens de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

Linhagem	Média do crescimento micelial (cm ²)	Taxa de inibição (Im%)	Tipo de interação**
Controle fitopatígeno	52,28	0 ^d	---
Controle Benlate*	26,04	50,2 ^b	---
PL01 (<i>D. anacardii</i>)	37,33	28,6 ^c	B
PL03 (<i>Diaporthe</i> sp.)	21,39	59,1 ^a	A
PL09 (<i>Diaporthe</i> sp.)	29,09	44,4 ^b	A
PL18 (<i>Diaporthe</i> sp.)	35,72	31,7 ^c	A
PL39 (<i>D. infecunda</i>)	30,25	42,1 ^b	A
PL40 (<i>D. schini</i>)	21,17	59,5 ^a	A
PL43 (<i>D. anacardii</i>)	37,38	28,5 ^c	B
PL53 (<i>D. schini</i>)	26,30	49,7 ^b	A
PL61 (<i>Diaporthe</i> sp.)	35,60	31,9 ^c	A
PL63 (<i>D. infecunda</i>)	30,42	41,8 ^b	A
PL64 (<i>D. anacardii</i>)	22,58	56,8 ^a	A
PL66 (<i>D. infecunda</i>)	27,26	47,9 ^b	A
PL67 (<i>Diaporthe</i> sp.)	40,72	22,1 ^c	A
PL71 (<i>Diaporthe</i> sp.)	39,44	24,6 ^c	A
PL73 (<i>D. infecunda</i>)	26,66	49,0 ^b	A
PL74 (<i>D. infecunda</i>)	28,94	44,6 ^b	A

*Fungicida na concentração de 50 mg.mL⁻¹

**De acordo com a escala de Badalyan et al. (2002).

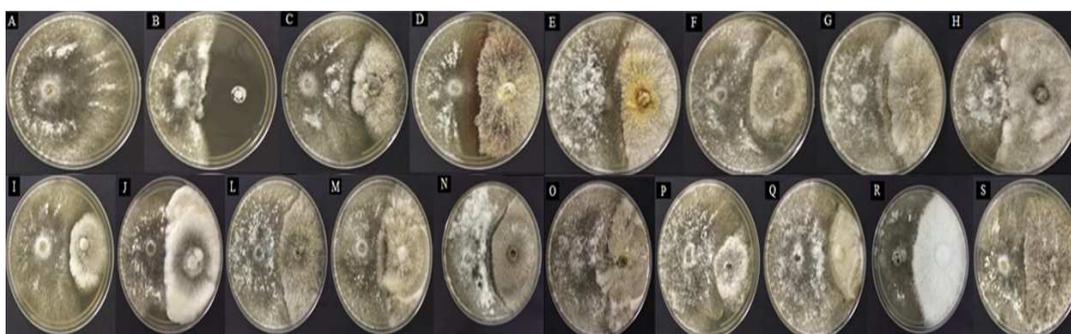


Figura 1. Antagonismo *in vitro* dos endófitos *Diaporthe* sp. (direita) contra *Sclerotinia sclerotiorum* (esquerda). **A.** Controle apenas com o fitopatígeno *S. sclerotiorum*. **B.** Controle do fitopatígeno (esquerda) contra fungicida Benlate (direita). **C.** PL01, **D.** PL03, **E.** PL09, **F.** PL 18, **G.** PL39, **H.** PL40, **I.** PL43, **J.** PL53, **L.** PL61, **M.** PL63, **N.** PL64, **O.** PL66, **P.** PL67, **Q.** PL71, **R.** PL73, **S.** PL74.

Conclusões

Foram observados resultados de antagonismo entre os endófitos *Diaporthe* sp. de *Pachystachys lutea* contra *Sclerotinia sclerotiorum* com valores superiores ao controle Benlate, com resultado estatisticamente significativo, segundo a ANOVA. Dessa forma, isolados como o PL03 (*Diaporthe* sp.), PL40 (*D. schini*) e PL64 (*D. anacardii*) apresentam um bom

potencial biotecnológico como inoculantes agrícolas microbianos, para o controle de *S. sclerotiorum*.

Agradecimentos

Fundação Araucária pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica. CAPES e CNPq pelo financiamento e apoio financeiro.

Referências

- AZEVEDO, J. L. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications, IN: KHARWAR, R. N. et al. (eds.) **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**, Springer, India, p. 17-22, 2014.
- BADALYAN, S. M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathol Mediterr**, v. 41, p. 200–225, 2002.
- CAMPANILE, G., RUSCELLI, A., & LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and in plant tests. **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, p. 237-246, 2007.
- LEITE, R. M. V. B.; OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V.; CASTIGLIONI, V. B. R. Incidência de podridão branca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol semeado após a colheita da safra de verão, no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 81-84, 2000.
- ROCHA, R.; ENGELS, C.; PILEGGI, S. A. V.; FILHO, D. S. J.; MATIELLO, R. R. M.; PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.). **Revista Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 73-78, 2009.