

ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill)

Juliana Bernardi-Wenzel¹, André Luiz Siqueira², Flávia Angélica Gonçalves, Burin², Daiane Paulina Reichert Hein³, José Adelmir da Silveira³, Sarah Romani³

RESUMO

Microrganismos endofíticos são capazes de viver no interior de uma planta sem causar danos à mesma, podendo favorecer seu hospedeiro. A soja é uma das culturas mais difundidas no mundo, e também muito acometida por fungos que promovem perdas grandes nas lavouras de soja, existindo poucas cultivares resistentes a diferentes patógenos. Este trabalho teve como objetivos: a) isolar fungos endofíticos de folhas de soja, b) determinar as frequências de colonização dos endófitos, c) avaliar o potencial desses fungos no controle dos fitopatógenos *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis* sp., *Fusarium solani* f. sp. *glycines* e d) identificar os gêneros isolados. Para o isolamento dos endófitos, folhas de plantas de soja foram desinfetadas e fragmentos inseridos sobre meio BDA. Após incubação de sete dias a 26°C a frequência de isolamento foi verificada pela quantidade de fragmentos que apresentaram crescimento fúngico. Os isolados foram purificados e testados em cultura pareada contra os fitopatógenos. Foi possível isolar 31 fungos endofíticos de soja. A frequência de isolamento foi de 100%. Dos isolados, 16 puderam ser classificados em nível de gênero em *Aspergillus* sp., *Phomopsis* sp., *Bipolaris* sp., *Nectria* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp. e *Botryotrichum* sp.. Quanto às interações entre os endófitos e os fitopatógenos, foi observado contato micelial, bem como produção de metabólitos secundários no meio, além de sobreposição, demonstrando os mecanismos que atuam na planta hospedeira. O índice de antagonismo variou de 9,33 a 78%, sendo que o isolado C31, pertencente ao gênero *Fusarium*, apresentou o maior índice, inibindo consideravelmente o crescimento de todos os patógenos testados. Conclui-se que fungos endofíticos isolados de soja possuem potencial antagonístico, podendo ser promissores para o uso no biocontrole de diferentes patógenos de soja.

Palavras-chave: *antagonismo; cultura pareada; biocontrole.*

ISOLATION AND ANTAGONISTIC ACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill)

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are able to live within a plant without causing harm to it and may even favor its host. Soy is one of the most widespread crops in the world, and also very affected by fungi that promote large losses in soybean crops, with few cultivars resistant to different pathogens. The purposes of this study were a) to isolate endophytic fungi from leaves of soybean; b) to determine the frequencies of colonization of endophytes; c) to evaluate the potential of these fungi in the control of the phytopathogens *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis* sp., *Fusarium solani* f. sp. *Glycines*; d) to identify the isolated genera. It was possible to isolate 31 endophytic fungi from soybean. The frequency of isolation was 100%. From the isolates, 16 could be classified according to genus into *Aspergillus* sp., *Phomopsis* sp., *Bipolaris* sp., *Nectria* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp. and *Botryotrichum* sp.. Regarding the interactions between endophytes and phytopathogens, mycelial contact was observed, as well as production of secondary metabolites in the middle, and also overlap, demonstrating the mechanisms which act on the host plant. The index of antagonism ranged from 9.33 to 78%, and isolate C31 (genus *Fusarium*) had the highest index, inhibiting significantly the growth of all tested pathogens, which may be the most promising to be used in biocontrol of different pathogen of soybean.

Keywords: *antagonism; dual culture; biologic control.*

INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior de tecidos ou órgãos dos vegetais realizando interações simbióticas mutualísticas ou neutras e, portanto, não causando doenças aos seus hospedeiros, podendo habitar o interior de um vegetal durante todo o seu ciclo de vida ou apenas em uma fase de seu desenvolvimento (1,2).

Nos últimos 20 anos os microrganismos endofíticos foram reconhecidos e estudados, graças à descoberta de sua capacidade de proteger seu hospedeiro do ataque de insetos, patógenos, herbívoros domésticos, possuindo capacidade de produzir alterações fisiológicas nos vegetais que os albergam, sendo responsáveis pela produção de fármacos como

¹ Docente do Curso de Ciências Biológicas – UNIPAR Campus Toledo.

² Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas - UNIPAR Campus Toledo.

³ Biólogos.

antibióticos e antifúngicos, antitumorais e promovendo o crescimento da planta (3-8).

Estudos de ordenamento de comunidades têm mostrado que comunidades de endofíticos são usualmente específicas aos hospedeiros ao nível de espécies, sugerindo que ainda existem muitos endofíticos a serem isolados e sua potencialidade investigada (9).

Os endófitos, assim como os fitopatógenos, têm capacidade de penetrar na planta hospedeira e se disseminar sistematicamente pelo hospedeiro. Dessa forma, os microrganismos endofíticos colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, o que permite o seu uso no controle biológico de doenças, pois podem agir no controle desses patógenos devido à atuação direta sobre eles, por antibiose, por indução de resistência sistêmica ou por competição por nutrientes (10).

A indução de resistência sistêmica (IRS) ocorre quando o endofítico penetra na planta e induz a mesma a produzir compostos ou modificar sua morfologia. Estas alterações morfológicas e fisiológicas podem incluir aumento da parede celular por deposição de lignina e glucanas e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento na planta hospedeira (11).

Alguns fatores de patogenicidade podem influenciar na capacidade do fitopatógeno em invadir o tecido do hospedeiro. A interrupção de alguns desses fatores pode impedir o patógeno de infectar a planta. A produção de algumas proteases pelo fungo *Trichoderma harzianum* (Rifai, 1969) foi capaz de inibir a atividade de enzimas hidrolíticas do patógeno *Botrytis cinerea* (Pers., 1794), através da clivagem da molécula, impedindo que o mesmo se desenvolvesse (12).

A identificação e seleção efetiva de antagonismo entre microrganismos é o primeiro passo para o controle biológico. Assim, a técnica da cultura pareada que visa em meio de cultura, estabelecer relações competitivas semelhantes às encontradas na natureza, fornece indícios da aplicabilidade destes fungos no controle de patógenos (13).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é um alimento de grande importância na indústria alimentícia e farmacêutica, sendo uma das culturas mais difundidas no Brasil, que aparece como o segundo maior produtor mundial, tendo

na safra 2009/2010 produzido 68,7 milhões de toneladas deste grão (14,15).

Sendo a soja de tamanha importância para a economia mundial e nacional, existem poucos estudos sobre a comunidade endofítica associada a essa cultura, especialmente quando considerados os fungos endofíticos. Devido as grandes áreas cultivadas, torna-se necessário o controle químico de patógenos dessa cultura. Assim, fungos endofíticos com o potencial de controlar fungos fitopatogênicos seriam uma alternativa no controle de doenças, minimizando os impactos causados pelo uso de produtos químicos no ambiente, surgindo como uma forma natural de biocontrole. Assim, os objetivos deste trabalho foram: a) isolar fungos endofíticos de folhas de soja, b) determinar as frequências de colonização dos endófitos, c) avaliar o potencial desses fungos no controle dos fitopatógenos *Alternaria solani* (Sorauer, 1896), *Rhizoctonia solani* (Kühn, 1858), *Phomopsis* sp., *Fusarium solani* ((Mart.) Sacc., 1881) f. sp. *glycines* pela técnica da cultura pareada e d) identificar os gêneros isolados, baseado na morfologia da colônia, análise citológica, utilizando chaves de classificação.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de endófitos

Para o isolamento dos fungos endofíticos, as folhas de soja foram submetidas a desinfestação de acordo com o método descrito por Araújo e colaboradores (10) e Pizzirani-Kleiner e colaboradores (16) com modificações. As folhas coletadas de plantas de soja foram lavadas em água corrente e posteriormente foram submergidas em solução Tween 80 a 0,01% para retirar a tensão superficial e foram enxaguadas com a água destilada autoclavada. Em seguida foram levadas a câmara de fluxo laminar e desinfestadas com solução de álcool a 70%, sendo imersas por um minuto, sob agitação vigorosa e constante. Logo, após foi descartada a parte líquida, restando só as folhas e o procedimento foi repetido utilizando solução de hipoclorito de sódio 3% durante três minutos e solução de álcool a 70% por mais 30 segundos e enxágue de duas vezes com água destilada autoclavada. Depois foi realizado o descarte da água, mantendo uma pequena quantidade no fundo do vidro para coleta de 100 µl para inoculação em placa de Petri como forma de controle negativo.

Concluída a desinfestação, as folhas de soja foram cortadas com bisturi em fragmentos de aproximadamente cinco milímetros. Foram distribuídos cinco fragmentos equidistantes de folhas de soja em cada placa de Petri, contendo meio BDA, acrescido de 1g.L^{-1} de terramicina. As placas foram incubadas por sete dias a uma temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após o crescimento dos fungos, esses foram caracterizados e enumerados, realizando a purificação dos endofíticos em meio BDA, visando purificá-los de acordo com as diferenças morfológicas existentes.

Determinação da frequência de colonização

A frequência de colonização das folhas foi determinada pela fórmula: $\text{FI} = \frac{\text{número de fragmentos foliares com crescimento fúngico}}{\text{número de total de fragmentos amostrados}} \times 100$.

Atividade antagonística *in vitro*

Os fungos endofíticos isolados de soja foram testados pelo método da cultura pareada com linhagens dos fungos fitopatogênicos: *Alternaria solani* (Sorauer, 1896) (MMBF 18/10), *Rhizoctonia solani* (Kühn, 1858) (MMBF 11/10) e *Fusarium solani* ((Mart.) Sacc., 1881) f. sp. *glycines* (MMBF 78/09) adquiridos do Instituto Biológico de São Paulo, e *Phomopsis* sp. isolado de lesões de soja, segundo Campanile e colaboradores (17). Em cada placa de Petri contendo meio BDA acrescido de terramicina, foram inseridos dois fragmentos de cinco milímetros do meio de cultura contendo os fungos endofíticos e o fitopatógeno a uma distância de quatro cm entre os dois fungos. Os ensaios foram realizados em triplicata. Como controle foi inserido um fragmento na mesma posição do teste contendo somente o fitopatógeno. As placas foram incubadas por 14 dias a $26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para análise das interações foi utilizada a escala de Badalyan; Innocenti; Garibyan (18), de acordo com os três tipos de interação possíveis: A, B e C, sendo C dividida em quatro sub-categorias (CA1, CA2, CB1 e CB2), onde: A = "deadlock" com contato micelial; B = "deadlock" a distância; C = crescimento do endofítico sobre o fitopatógeno sem "deadlock" inicial; CA1 e CA2 = crescimento parcial e completo do endofítico sobre o fitopatógeno depois de "deadlock" inicial com contato micelial; CB1 e CB2 = crescimento parcial e completo do endofítico sobre o fitopatógeno depois de "deadlock" inicial a distância.

O índice de antagonismo foi calculado pelo crescimento radial, através do diâmetro da colônia:

$$\text{IA} = \frac{(\text{RM} - \text{rm})}{\text{RM}} \times 100$$

Em que: rm = raio da colônia do antagonista, RM = média dos três raios da colônia em outras direções.

Os dados estatísticos foram analisados pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, utilizando o Software Sisvar (19).

Identificação dos endofíticos

Para a identificação dos fungos endofíticos, as colônias isoladas foram inoculadas em meio BDA e incubadas a temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e posteriormente foi realizado o micro-cultivo de acordo com Kern e Blevins (20) em meio BDA de todos os isolados, que foram incubados a $26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por cinco dias. Após este período, observou-se as estruturas em microscópio óptico, avaliando os aspectos morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas, sendo comparadas com auxílio de chaves de classificação (21,22).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 200 fragmentos foliares amostrados foi possível isolar 31 fungos endofíticos morfológicamente distintos das folhas de soja. Os fungos endofíticos foram nomeados com a letra C de soja convencional, tendo o primeiro isolado recebido o número 1 e assim sucessivamente (C1, C2).

Foi obtida uma frequência de isolamento (FI) de 100% utilizando desinfestação com hipoclorito de sódio 3% por 3 minutos. Em comparação com outras plantas, pode-se considerar uma frequência de isolamento alta. Costa Neto (23) obteve frequência de isolamento de 23,9%, ao investigar microrganismos endofíticos de *Bactris gasipaes* (Kunth), palmeira tropical pupunheira.

Quanto à quantidade de endófitos isolados, Pileggi (24), isolou fungos endofíticos

de folhas, pecíolos e sementes da planta medicinal espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss) como objetivo de investigar o seu potencial farmacológico, obtendo 915 endofíticos de diferentes tecidos das plantas. Bernardi-Wenzel e colaboradores (25) também isolaram de um total de 1000 fragmentos foliares de duas árvores de *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini) 127 endófitos. Outros trabalhos demonstraram que a frequência de isolados, bem como as espécies isoladas podem ser variáveis, dependendo dos tecidos vegetais amostrados e das espécies investigadas (26,27,28).

Cannon e Simmons (29) observaram que 9 a 23% dos 2.520 fragmentos amostrados não apresentaram crescimento de endofíticos, sugeriram que o tamanho do fragmento amostrado é importante, podendo interferir no número de endófitos isolados. Se o fragmento amostrado for grande, os microrganismos das bordas podem impedir o crescimento dos mais distantes, portanto, o ideal é amostrar fragmentos pequenos para obtenção de um maior número de isolados.

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 eficiente na remoção de microrganismos epifíticos e comprovando que os microrganismos obtidos são realmente endofíticos (30).

Quanto à identificação dos isolados pela técnica de microcultivo e análise das estruturas utilizando chaves de classificação, foi possível identificar o gênero de 16 isolados. Os isolados endofíticos identificados foram agrupados em 10 gêneros distintos: *Aspergillus* spp. (C2, C14, C15, C16 e C32), *Phomopsis* spp. (C11 e C21), *Bipolaris* spp. (C8 e C22), *Nectria* sp. (C5), *Nigrospora* sp. (C7), *Fusarium* sp. (C31), *Penicillium* sp. (C24), *Phoma* sp. (C26), *Alternaria* sp. (C18), *Botryotrichum* sp. (C1). Os demais fungos ainda serão identificados via clássica e molecular.

Os endofíticos dos gêneros *Phomopsis*, *Bipolaris* e *Fusarium* são normalmente encontrados como parasitas causadores de doenças em plantas, mas foram isolados na condição de endofítico, sem causar danos aparentes a planta, o que comprova que um

microrganismo pode viver somente uma parte de seu ciclo de vida como endófito (11).

Almeida e colaboradores (31) utilizando plantas cultivadas no campo e plantas micropropagadas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) isolaram os fungos endofíticos *Fusarium oxysporum* (Schltld., 1824), *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum* (Link, 1815) das plantas cultivadas *in vitro*; e *Fusarium* sp., *F. proliferatum* ((Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, 1982), *F. oxysporum* (Schltld., 1824), *Colletotrichum* sp., *Alternaria gaisen* (Nagano, 1928), *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum* (Link, 1815) das plantas *in vivo*, indicando que patógenos são frequentemente encontrados como endofíticos, mesmo em diferentes condições de cultivo.

Larran e colaboradores (32), também determinaram a frequência de infecção de folhas, caules e grãos de plantas de trigo coletadas na Argentina. De um total de 1.750 segmentos amostrados, obtiveram o isolamento de 722 fungos endofíticos, identificados como pertencentes a 30 gêneros. Os mais encontrados foram *Alternaria alternata* ((Fr.) Keissl., 1912), *Cladosporium herbarum* ((Pers.) Link, 1816), *Epicoccum nigrum* (Link, 1815), *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula rubra* ((Demme) Lodder, 1934), *Penicillium* sp. e *Fusarium graminearum* (Schwabe, 1839), apresentando maior frequência de colonização por tecido analisado, conforme o obtido nesse trabalho, com alta frequência de isolamento e muitos gêneros isolados em comum.

O resultado da identificação dos gêneros está de acordo com outros trabalhos que isolaram endofíticos de soja como Pimentel e colaboradores (33) e Angonese e colaboradores (34), que como neste trabalho também isolaram os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Bipolaris* e *Nigrospora*, indicando a prevalência de alguns gêneros de fungos na cultura de soja, demonstrando uma especificidade de colonização de um fungo em uma planta-hospedeira.

Pelo teste da cultura pareada foram observadas interações entre os fungos endofíticos e os fitopatógenos *A. solani*, *R. solani*, *Phomopsis* sp. e *F. solani*. Pode-se observar diferentes tipos de interações entre os endófitos e cada um dos fitopatógenos, sendo que dos 31 fungos isolados, 26 obtiveram algum tipo interação com pelo menos um dos patógenos, seja inibindo o seu crescimento por

uma barreira ou por produção de algum metabólito secundário ou ainda pelo crescimento do endofítico sobre o fitopatógeno.

Das interações apresentadas entre os endófitos e os fitopatógenos houve resultados diferentes para alguns endófitos, mas foram obtidas 38 interação do tipo A com “deadlock” com contato micelial, cinco com interação do tipo B com “deadlock” à distância, dez com interação CA1 com crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógeno depois do “deadlock” inicial com contato micelial, cinco com interação do tipo CA2 com crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógeno depois

de “deadlock” inicial com contato micelial e um com interação do tipo CB1 com crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógeno depois de “deadlock” inicial à distância. A Tabela 1 mostra os tipos de interações apresentadas por cada endofítico em relação a cada um dos fitopatógenos. Essas interações indicam que dependendo do grupo de fungos, provavelmente em nível de gênero tanto do endofítico, quanto do fitopatógeno, ocorrem diferentes modos de ação dos endofíticos sobre o fitopatógeno, o que pode indicar um potencial para produção de metabólitos ou competição direta pelo espaço e nutrientes, conforme ocorre dentro da planta hospedeira.

Tabela 1. Interações entre fungos endofíticos isolados de *Glycine max* e os fitopatógenos *Alternaria solani* (Sorauer, 1896), *Fusarium solani* ((Mart.) Sacc., 1881), *Phomopsis* sp. e *Rhizoctonia solani* (Kühn, 1858) utilizados nos testes de antagonismo *in vitro*.

Fitopatógeno	Tipo de interação / Endofítico				
	A	B	CA1	CA2	CB1
<i>A. solani</i>	C8, C12, C14, C17, C21, C23, C25	C16, C32	C7, C10, C11, C13, C31	C18, C19, C28, C29	C1
<i>F. solani</i> f. sp. <i>glycines</i>	C1, C10, C11, C12, C13, C18, C19, C20, C21, C23, C24, C26, C27, C28, C29, C31	C4, C6, C7	-	-	-
<i>Phomopsis</i> sp.	C4, C7, C21, C22, C28, C31	-	C10, C11, C29	C6	-
<i>R. solani</i>	C8, C6, C10, C16, C18, C19, C28, C31, C32	-	C2, C7	-	-

* Os demais isolados que não estão listados, não apresentaram interações.
Fonte: os autores.

Observou-se para *R. solani*, um crescimento muito rápido, o que impediu na maioria dos casos o crescimento do endofítico, sugerindo, portanto, um fitopatógeno mais difícil de ser controlado pelos endofíticos avaliados. Pode-se observar uma predominância de interação do tipo A (64%) em que os dois fungos apresentam contato micelial e o endofítico poderia impedir por contato direto e competição por nutrientes o crescimento do patógeno, seguida das interações CA1 e CA2 (25%) em que após o primeiro contato, o endofito pode crescer sobre o patógeno, provavelmente reduzindo sua possibilidade de absorção dos nutrientes do

meio, interação B (9%) em que o endofito estaria produzindo e liberado no meio algum metabólito que impede o crescimento do fitopatógeno e interação CB1 (2%), na qual após produção de algum composto e liberação no meio o endofítico cresceu parcialmente sobre o patógeno.

Esses resultados corroboram com os encontrados por Woods e colaboradores (35), verificando as interações entre diferentes fungos isolados de *Picea sitchensis* ((Bong.) Carrière), obtiveram interações entre praticamente todos os fungos isolados, apresentando índice de até 89% da interação

do tipo A, índice de até 51% da interação CA1 ou CA2, e índice de até 45% da interação do tipo B.

Foi possível verificar também que alguns fungos endofíticos apresentaram comportamentos diferentes em relação a diferentes patógenos, o que foi observado, com os isolados C1 (*Botryotrichum* sp.), C4, C6, C7 (*Nigrospora* sp.), C16 e C32 (ambos *Aspergillus* sp.), que apresentaram interações tanto com contato micelial, quanto à distância, indicando que podem produzir algum metabólito que age de maneira diferencial sobre alguns patógenos e menos em relação a

outros. Esses endófitos apresentaram interações dos tipos B ou CB1, que são as mais promissoras para a utilização no biocontrole, pois por serem à distância, indicam que houve produção de algum composto e sua liberação no meio de cultura, que pode futuramente ser purificado, identificado e melhor analisado quanto a sua atividade antimicrobiana. Esses compostos podem, em alguns casos, levar a planta a desenvolver resistência sistêmica contra os fitopatógenos, o que também pode ser investigado. Algumas interações estão apresentadas na Figura 1.

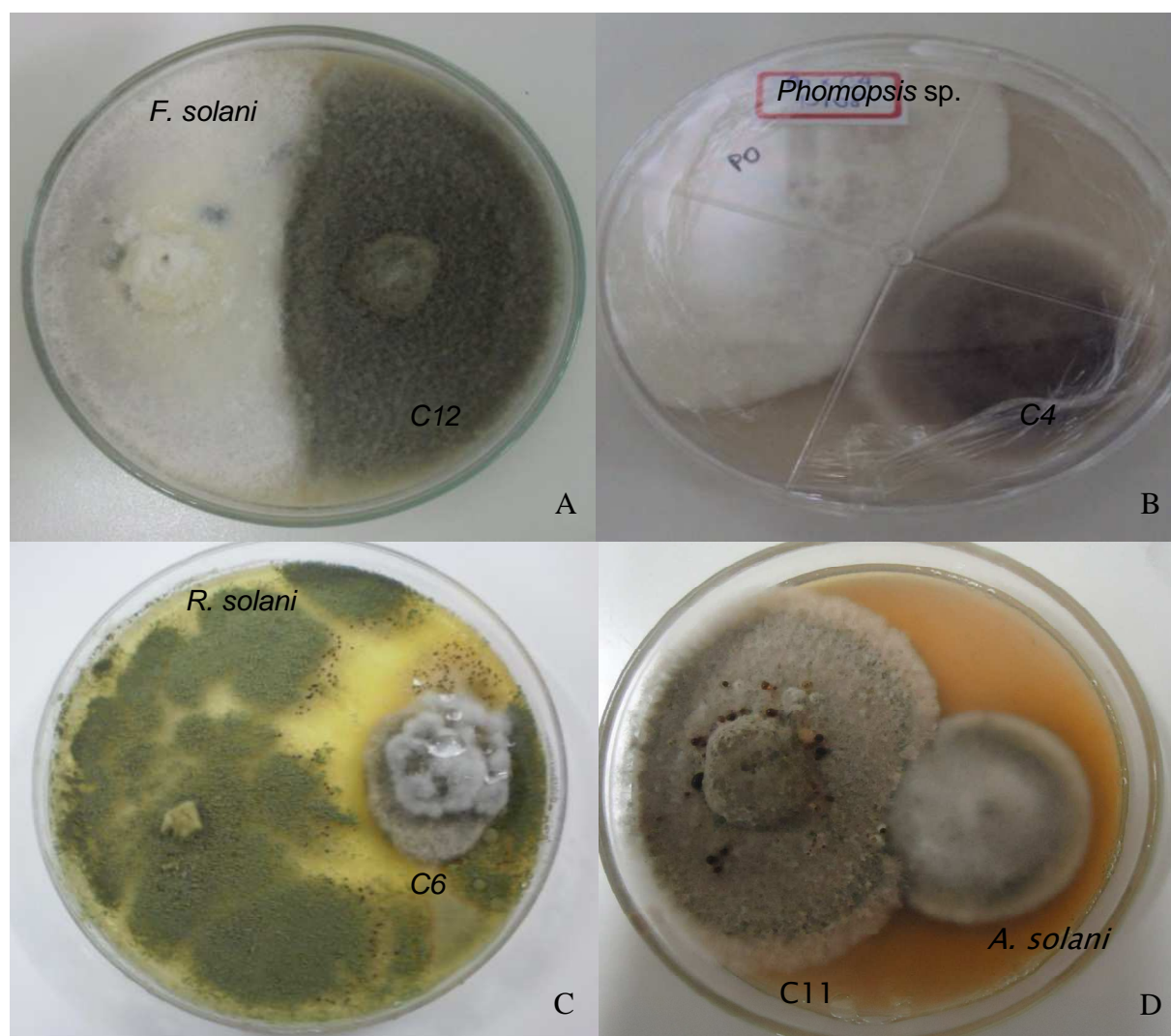


Figura 1. Interações apresentadas entre os fungos endofíticos isolados de soja e os patógenos avaliados. A e B: Interação tipo A: “deadlock” com contato micelial (*F. solani* e C12; *Phomopsis* sp. e C4); C: Interação tipo B: “deadlock” à distância (*R. solani* e C6); D: Interação tipo CA1: crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógeno depois do “deadlock” inicial com contato micelial (*A. solani* e C11).

Fonte: os autores.

Pode-se destacar quanto a maior abrangência de interações contra diferentes patógenos C7 (*Nigrospora* sp.), C10, C28 e C31 (*Fusarium* sp.), que apresentaram interações contra os quatro fitopatógenos avaliados.

Relações de antagonismo semelhantes foram encontradas por Wicklow et al. (38), que verificaram, em testes de cultura pareada, entre os fitopatógenos *Fusarium verticillioides* ((Sacc.) Nirenberg, 1976) e *Aspergillus flavus* (Link, 1809) e o fungo endofítico isolado de milho *Acremonium*

zeae (Gams e Sumner, 1971) que dois entre os treze isolados de *A. zeae* testados provocaram a inibição do crescimento de ambos os patógenos.

Para os fungos endofíticos que apresentaram algum tipo de interação com algum dos patógenos testados, foi calculado o índice de antagonismo, levando em consideração quanto o endófito promoveu diminuição do crescimento do fitopatógeno. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de redução do crescimento micelial de *Alternaria solani* (Sorauer, 1896), *Fusarium solani* ((Mart.) Sacc., 1881), *Phomopsis* sp. e *Rhizoctonia solani* (Kühn, 1858) provocada pelas interações com os fungos endofíticos isolados de soja em relação ao controle.

Endofíticos	Redução do crescimento dos fitopatógenos (%)			
	<i>A. solani</i>	<i>F. solani</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>R. solani</i>
C1	48,67e	22,33b	-	-
C2	-	-	-	9,33a
C4	-	34,33d	35,67d	-
C6	-	31,67d	29,67c	25,67b
C7	58,33f	37,00d	24,67b	29,67c
C8	39,00e	-	-	39,67e
C10	48,00e	39,00e	39,33e	39,67e
C11	29,67c	49,33e	44,67e	-
C12	24,67b	47,33e	-	-
C13	39,33e	35,33d	-	-
C14	24,33b	-	-	-
C16	41,33e	-	-	21,67b
C17	21,33b	-	-	-
C18	42,00e	32,33d	-	52,67f
C19	39,00e	14,67a	-	36,00d
C20	-	29,67c	-	-
C21	41,67e	45,67e	37,67d	-
C22	-	-	25,66c	-
C23	33,00d	30,67c	-	-
C24	-	31,00d	-	-
C25	25,67c	-	-	-
C26	-	26,67c	-	-
C27	-	23,00b	-	-
C28	50,00e	21,33b	23,67b	41,00e
C29	37,33d	39,00e	35,33d	-
C31	78,00h	46,66e	43,67e	67,00g
C32	32,00d	-	-	21,67b
Controle	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a

- Não foi possível determinar ou não houve interação.* médias representadas com letras diferentes indicam diferença estatística significativa pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para cada patógeno.

Fonte: os autores.

Pode-se verificar que o índice de antagonismo variou de 9,33 até 78% entre os isolados, havendo diferença significativa em relação ao controle, sugerindo que tenham potencial para uso no biocontrole. Alguns isolados destacaram-se pelo índice de antagonismo, apresentando média de índice bem superior aos demais isolados para mais de um patógeno, podendo-se destacar o isolado C31, pertencente ao gênero *Fusarium*, que apresentou o maior índice, inibindo consideravelmente o crescimento de todos os patógenos testados.

Relações antagônicas entre endófitos e fitopatógenos, já foram verificadas em outros trabalhos. O antagonismo entre o fungo endofítico *Trichoderma harzianum* (Rifai, 1969) e o fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* ((Fr.) Keissl., 1912) foi avaliado sob diferentes condições ambientais de temperatura e atividade de água por Sempere e Santamarina (37). Na análise microscópica os autores verificaram que *T. harzianum* luta por espaço e nutrientes, realizando antagonismo com *A. alternata* e diminuindo seu crescimento, sendo um grande candidato ao biocontrole deste patógeno.

Martins-Corder e Melo (38), analisando a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em controlar o fitopatógeno da berinjela *Verticillium dahliae* (Kleb., 1913), verificaram que dentre os 47 isolados de *Trichoderma* spp. testados pelo antagonismo em placa, pelo menos 10 obtiveram alto índice de antagonismo, sendo que a maioria colonizou e produziu esporos em abundância sobre as colônias de *V. dahliae*, indicando grande capacidade de antagonismo.

Resultados semelhantes aos apresentados por este trabalho foram encontrados por Campanile e colaboradores (17), em estudo analisando as interações entre isolados de plantas do gênero *Quercus* contra *Diplodia corticola* (Phillips, Alves e Luque, 2004), agente causal do cancro e necrose em diferentes plantas vasculares, que encontraram diferentes interações entre os isolados e o fitopatógeno, com redução de até 28,5% do crescimento do patógeno em relação ao controle, indicando que os percentuais de inibição dos patógenos nesse trabalho foram altos.

Rocha e colaboradores (39) selecionaram endofíticos do confrei (*Symphytum officinale* L.) para controle biológico *in vitro* do fitopatógeno *Sclerotinia*

sclerotiorum ((Lib.) de Bary, 1884), onde obtiveram quatro sepas de endofíticos (*Trichophyton* sp., *Chrysosporium* sp., *Candida pseudotropicalis* ((Castell.) Basgal, 1931) e *Candida tropicalis* ((Castell.) Berkhout, 1923) que apresentaram uma melhor atividade antagônica contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, assim como os endofíticos isolados neste trabalho, que apresentaram atividade antagonística contra diferentes patógenos de soja.

Os resultados apresentados no presente trabalho reforçam a necessidade de se estudar o potencial biotecnológico de endófitos isolados de diferentes plantas, uma vez que foram obtidos índices de antagonismo de endófitos contra diferentes fitopatógenos de até 78%, indicando que estes apresentam atividade antagonística e que devem ser melhor investigados *in vivo* para verificar sua possível utilização no biocontrole.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se com este trabalho que os fungos endofíticos isolados de folhas de soja possui potencial para o controle de fitopatógenos de soja, sendo promissores para o uso no biocontrole de doenças dessa cultura.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Paranaense – UNIPAR pelo apoio financeiro.

Juliana Bernardi-Wenzel, André Luiz Siqueira, Flávia Angélica Gonçalves, Burin, Daiane Paulina Reichert Hein, José Adelmir da Silveira, Sarah Romani

Endereço para correspondência: Av. Parigot de Souza, 3636 – Jd. Prada, CEP 85903-170 – Toledo, Paraná, Brasil. Fone/Fax: (45) 3277-8500. E-mail: julianab@unipar.br

Recebido em 22/05/2012
Revisado em 06/08/2012
Aceito em 31/10/2012

REFERÊNCIAS

- (1) BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Mycomycetum**. Leipzig: Engelman, 1866.
- (2) AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. **Mutation Research**, v. 544, p. 223–233, 2003.
- (3) AZEVEDO, J.L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, p. 225-229, out. 1999.
- (4) AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 40- 65, abr. 2000.
- (5) BULTMAN, T.L.; BELL, G.D. Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. **OIKOS**, v. 103, p. 182–190, 2003.
- (6) MUCCIARELLI, M.; SCANNERINI, S.; BERTEA, C.; MAFFEI, M. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, v. 158, p. 579-591, 2003.
- (7) STROBEL G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, dez. 2003.
- (8) GANGE, A.C.; DEY, S.; CURRIE, A.F.; SUTTON, B.C. Site- and species-specific differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants. **Journal of Ecology**, v. 95, n. 4, p. 614–622, jul. 2007.
- (9) PAMPHILE, J.A.; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*L). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 391-396, 2002.
- (10) ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; LIMA, A.O.S.; MARCOM J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. 1. ed. Piracicaba: CALQ., 2002.
- (11) PEIXOTO-NETO, P.A.S., AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biociência Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.
- (12) ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 177-189, 1999.
- (13) KAMALAKANNAN A.; MOHAN, L.; HARISH, S.; RADJACOMMARE, R. AMUTHA, G.; CHITRA, K.; KARUPPIAH, R.; MAREESWARI, P.; RAJINIMALA, N.; ANGAYARKANNI, T. Biocontrol agents induce disease resistance in *Phyllanthus niruri* Linn against damping-off disease caused by

Rhizoctonia solani. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 43, p. 187-194, 2004.

(14) EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, Londrina. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16. Acesso em: 20 maio de 2012.

(15) SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (SEAB) – DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL (DERAL). Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/cprbr.pdf>. Acesso em: 20 maio de 2012.

(16) PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; FERREIRA, A.; LIMA, A.O.S.; ANDREOTE, F.D.; PIMENTEL, I.C.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; QUECINE, M.C.; MARTINS, M.K.; LACAVA, P.T.; ROSSETO, P.B.; STUART, R.M.; ARAÚJO, W.L. **Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. 1.ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2010.

(17) CAMPANILE, G.; RUSCELI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, n. 1, p. 237-246, 2007.

(18) BADALYAN, S.M., INNOCENTI, G., GARIBYAN, N.G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 41, p. 200-225, 2005.

(19) FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos. **Anais...**, São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

(20) KERN, M.E., BLEVINS, K.S., **Micologia Médica**. 2. ed. São Paulo: Premier, 1999.

(21) ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1970.

(22) BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Kew: Burgess Publishing Company, 1972.

(23) COSTA-NETO, P.Q. **Isolamento e Identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares**. 2002. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

(24) PILEGGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. 2006. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

(25) BERNARDI-WENZEL, J.; GARCIA, A.; RUBIN FILHO, C. J.; PRIOLI, J. A.; PAMPHILE, J. A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biological Research**, v. 43, p. 375-384, 2010.

(26) SOUZA, A.O.; PAMPHILE, J.A.; ROCHA, C.L.M.S.C.; AZEVEDO, J.L. Plant-microbe interactions between maize (*Zea mays* L.) and endophytic microorganisms observed by Scanning Electron Microscopy. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 357-359, 2004.

(27) SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

(28) MAGALHÃES, W. C.S.; MISSAGIA, R. V.; COSTA, F.A.F.; COSTA, M.C.M. Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 3, p. 267-273, jul./set. 2008.

(29) CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host-preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v. 94, p. 210-220, 2002.

(30) AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, Jr W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini LA, Barros, NM, Azevedo JL. **Biociência: avanços na**

agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUSC, 2002. p. 235-268.

(31) ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 467-470, maio. 2005.

(32) LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M.R.; MORENO, V. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 565-572, 2007.

(33) PIMENTEL, I.C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R.M.; AZEVEDO, J.L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. **Brazilian Archives of Biology and Thecnology**, v. 49, n. 5, p. 705-711, set. 2006.

(34) ANGONESE, M.T.; GAIO, J.; ILTCHENCO, J.; MAGRINI, F.E.; RIBEIRO, R.T.S.; SARTORI, V.C. Isolamento de Fungos Endofíticos de *Glicine* sp. sob Diferentes Sistemas de Produção. In: XVII ENCONTRO DE JOVENS PESQUISADORES DA UCS, Caxias do Sul. **Anais do XVII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS**, 2009.

(35) WOODS, C.M.; WOODWARD, S.; REDFERN, D.B. *In vitro* interactions in artificial

and wood-based media between fungi colonizing stumps of Sitka spruce. **Forest Pathology**, Berlin, v. 35, p. 213-229, 2005.

(36) WICKLOW, D.T.; ROTH, S.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v. 109, p. 610-618, maio. 2005.

(37) SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. **Mycopathologia**, v. 163, p.183-190, 2007.

(38) MARTINS-CORDER, M.P., MELO, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Science Agriculture**, v. 55, n. 1, 1998.

(39) ROCHA, R.; LUZ, D.E.; ENGELS, C.; PILEGGI, S.A.V.; JACCOUD FILHO, D.S.; MATIELLO, R.R.; PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 73-78, 2009.