

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEUS EXTRATOS BRUTOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Justicia brandegeana* WASH. & SMITH CONTRA O FITOPATÓGENO *Alternaria alternata*

Ricardo Schincariol Trugillo, Andressa Domingos Polli, João Alencar Pamphile (Orientador), e-mail: prof.pamphile@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular /Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Multidisciplinar, Biotecnologia.

Palavras-chave: Endófito, Fitossanidade, Metabólito secundário.

Resumo

Micro-organismos endofíticos, principalmente fungos, vem sendo utilizados para fins industriais e farmacêuticos pela gama de compostos produzidos, facilidade de reprodução e purificação de seus compostos. Apenas um endófito pode produzir cerca de 30 compostos diferentes, aumentando também o interesse biotecnológico relacionado ao controle biológico de pragas nas lavouras do mundo inteiro. Assim, foram utilizadas duas linhagens de fungos endofíticos da planta *Justicia brandegeana* Wash. e Smith (JB-09 e JB-270) para verificar o potencial de inibição micelial por atividade antagonística e da produção de seus extratos brutos de metabólitos secundários contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*. Em todos os testes realizados foram obtidos índice de inibição superior a 23,5%, sendo que o extrato bruto de metabólitos secundários da linhagem JB-09 em concentração 30 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ apresentou o melhor Índice de inibição, 30,2%, valor acima do encontrado utilizando-se fungicida Benlate, nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ (13,5% e 24,8% respectivamente). Desta forma, acredita-se que o metabólito dessa linhagem seja promissor para o controle biológico efetivo do fitopatógeno *A. alternata*.

Introdução

As plantas servem de abrigo a inúmeros micro-organismos que habitam externa e internamente os tecidos vegetais. Dentre esses encontram-se os micro-organismos endofíticos ou endófitos, como fungos e bactérias, presentes no interior dos tecidos ou órgãos vegetais em relação simbiótica, ou seja, sem causar dano ao hospedeiro. Com a aplicação de estratégias como competição por nutrientes, espaço e produção de enzimas hidrolíticas que auxiliam a deterioração de células dos micro-organismos patogênicos, os endófitos podem atuar direta ou indiretamente sobre o desenvolvimento das plantas. Eles também podem aumentar a resistência das plantas contra estresses bióticos e abióticos, produzir hormônios de crescimento, antibióticos, enzimas e ajudar na obtenção de nutrientes a partir do meio ambiente, assim como outros compostos de interesse biotecnológico (AZEVEDO, 2014). No ano de 1928, Fleming descobriu o primeiro metabólito fúngico eficaz produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, a penicilina. Este episódio marcou o início de uma nova era na medicina, a chamada Era de Ouro dos antibióticos. Em menos de

100 anos, já haviam sido cadastradas nos bancos de dados Caplus e Medline, 11376 publicações sobre o tema, inclusive patentes, demonstrando o crescente interesse por essa área.

Atualmente, existem descritos compostos produzidos por fungos endofíticos com atividade anti-HIV, antileishmania, atividade citotóxica, anti-acetilcolinesterase e muitas outras atividades biológicas (NISA et al., 2015).

Materiais e métodos

As linhagens de fungos endofíticos Jb-09 e Jb-270, isoladas de folhas de *Justicia brandegeana*, e o fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* utilizados neste trabalho, são pertencentes à coleção do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá (LBIOMIC/UEM).

Para a avaliação da atividade antagonista *in vitro* dos fungos endofíticos contra *Alternaria alternata* foi realizada a técnica de cultura pareada (CAMPANILE et al., 2007) com modificações. Discos de 6mm de diâmetro de colônias crescidas durante 7 dias dos isolados endofíticos e do fitopatógeno, foram inoculados em polos opostos de placas de Petri, contendo meio batata dextrose e ágar (BDA), à distância de 4 cm, e incubadas à 28°C por 7 dias. Os testes foram realizados em triplicata, assim como o controle negativo sem o fungo endofítico. As interações competitivas entre endófitos e fitopatógeno foram analisadas de acordo com três tipos de interações: A, B e C, propostas por (BADALYAN et al., 2002). O índice de inibição (Im%) foi avaliado pela aferição de área do crescimento micelial do fitopatógeno, utilizando o software ImageJ (v 1.46r), em comparação com a área do controle, de acordo com a fórmula: $Im\% = (1 - MT/MC) \times 100$, onde Im%= Índice de inibição do crescimento micelial em porcentagem, MT=Média da área da triplicata aferida para o tratamento em cm², e MC= Média da área da triplicata aferida para o controle em cm². As médias de crescimento micelial do fitopatógeno contra o endófito foram comparadas com os controles de cada tratamento pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$) visando evitar a ambiguidade de grupos estatísticos, com auxílio do software estatístico Sisvar 5.3.

Para a obtenção dos extratos brutos de metabólitos secundários, os fungos endofíticos foram colocados em erlenmeyers contendo 500 mL de caldo batata e dextrose (BD), incubados em condição estacionária por 21 dias à 28°C. Os meios fermentados foram filtrados e para a extração líquido-líquido foi utilizado como solvente orgânico destilado o acetato de etila de grau P. A. A fração orgânica obtida após separação das fases por partição foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo obtendo os extratos brutos.

Para avaliar a atividade inibitória foi utilizado o teste de difusão em disco. Foram inoculados, em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, disco de 6 mm de diâmetro do fitopatógeno e, em posição oposta a 4 cm de distância, foi colocado um disco de papel filtro de mesmo diâmetro, onde foram adicionados 10 µL do extrato de metabólitos. As concentrações utilizadas dos extratos foram de 10 e 30 µg.µL⁻¹, diluídos em metanol. Para o controle negativo foi utilizado apenas o metanol, e para o controle positivo o fungicida Benlate, nas concentrações de 10 e 50 µg.µL⁻¹. Todos os testes foram realizados em triplicata. A análise estatística foi feita utilizando o teste Scott-Knott, realizada pelo software estatístico Sisvar 5.3.

Resultados e discussão

No teste de cultura pareada, observou-se que a linhagem Jb09 foi a que apresentou o maior índice de inibição contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*, com 24,0% de inibição, e a linhagem Jb270 apresentou índice de inibição de 23,5% (Tabela 1), no qual ambos demonstraram ter atividade antagonista comparados ao controle.

Tabela 1. Teste de antagonismo de fungos endofíticos (Jb09 e Jb270) isolados de *J. brandegeana* contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*.

Linhagens	Média do crescimento micelial*	Im%**
Jb09	15,545	24,0
Jb270	15,655	23,5
<i>Alternaria alternata</i>	20,451	-

*Área de crescimento do fitopatógeno, em cm². **Índice de inibição percentual (Im%).

Pode-se observar que as duas linhagens de fungos endofíticos Jb09 e Jb270 apresentaram inibição de crescimento à distância, classificando-se assim como interação competitiva do tipo B, segundo a escala de Badalyan et al.(2002) (Figura 1).

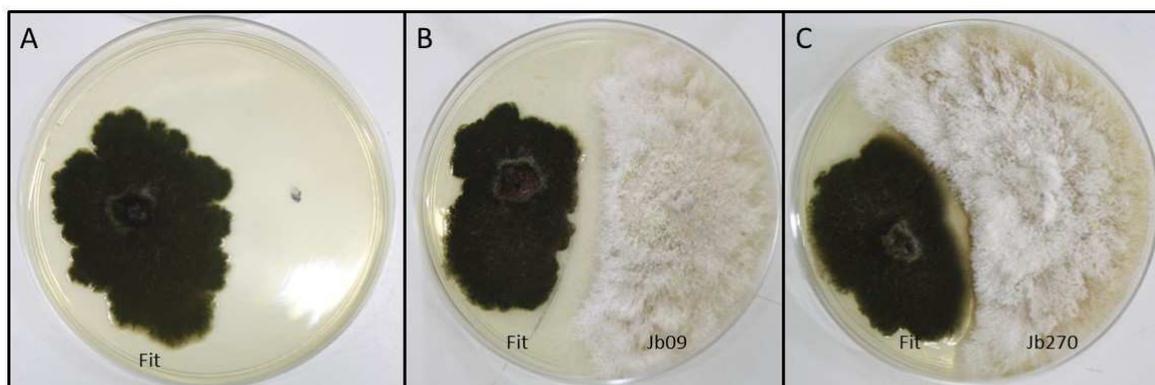


Figura 1. Atividade antagonista *in vitro* dos fungos endofíticos isolados de *J. brandegeana* contra *Alternaria alternata*. A. Controle com *A. alternata*; B. Endófito Jb09 contra *A. alternata*; C. Endófito Jb270 contra *A. alternata*. Fit – fitopatógeno.

No teste de atividade antifúngica dos extratos, constatou-se que o metabólito da linhagem endofítica JB-09 e JB-270 em concentração de 30 µg.µL⁻¹ obteve resultados significativos, 30,2% e 25,6% respectivamente, ultrapassando em porcentagem inibitória inclusive os controles positivos com o fungicida (13,5% concentração 10 µg.µL⁻¹ e 24,8% concentração de 50 µg.µL⁻¹) (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antifúngica dos extratos brutos de metabólitos secundários dos fungos endofíticos JB-09 e JB-270 contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*.

Tratamentos	Média de crescimento micelial (cm ²)	Índice de inibição (Im%) *
JB-09 (10 µg.µL ⁻¹)	36,185	23,9 b
JB-09 (30 µg.µL ⁻¹)	33,183	30,2 a

JB-270 (10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	36,301	23,6 b
JB-270 (30 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	35,363	25,6 a
Controle negativo (metanol)	47,535	0 c
Controle positivo (10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	41,130	13,5 c
Controle positivo (50 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	35,770	24,8 a

* Índice de inibição seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

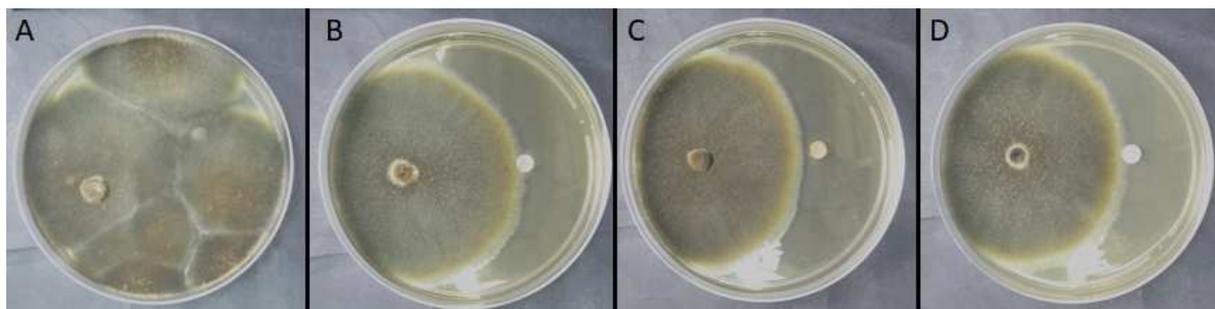


Figura 2. Teste de difusão em disco com extrato bruto de metabólitos secundários contra o fitopatógeno *Alternaria alternata*. a) controle negativo (metanol); b) controle com fungicida (50 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); c) extrato JB-09 (30 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), d) extrato JB-270 (30 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

Conclusões

O extrato bruto de metabólitos secundários das linhagens endofíticas JB-09 e JB270 apresentaram resultados promissores *in vitro* no controle biológico do fitopatógeno *Alternaria alternata*, abrindo um leque para posteriores testes *in vivo* e de caracterização e otimização da produção de compostos bioativos com aplicação biotecnológica em endófitos de *Justicia brandegeana*.

Agradecimentos: Capes, CNPq e Fundação Araucária.

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 xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathology Mediterranean**, 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 planta test. **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, p. 237-246, 2007.

NISA, J.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, A. S. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**. v. 82, p. 50-59, 2015.