

PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Justicia brandegeana* WASH. & SMITH E SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO CONTROLE DO FITOPATÓGENO *Colletotrichum* sp.

Guilherme Henrique Moura e Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Cláudio Issamu Kokubu, 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: antifúngico, biotecnologia microbiana, controle biológico.

Resumo:

Justicia brandegeana popularmente conhecida por “camarão-vermelho” é um arbusto nativo do México. Em seu interior estão presentes micro-organismos endofíticos que vivem em simbiose com o vegetal, que podem ser utilizados no controle biológico de fitopatógenos e também produzir compostos naturais bioativos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antagonista *in vitro* de duas linhagens de fungos endofíticos, Jb224 e Jb252, isolados da planta *J. brandegeana*, e testar a atividade antifúngica dos seus extratos brutos de metabólitos secundários contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp.. Observou-se que a linhagem Jb252 apresentou o maior índice de inibição com 47,5%, e ambas as linhagens endofíticas apresentaram inibição de crescimento por contato micelial. O extrato bruto de metabólitos secundários do endófito Jb224 apresentou o maior índice de inibição com 7,63% na concentração de 10 mg.mL⁻¹, porém a diferença entre o tratamento e o controle não foi significativa. Os resultados do teste de antagonismo demonstram que as linhagens endofíticas Jb224 e Jb252 podem ser uma alternativa biológica e sustentável para o controle deste fitopatógeno que acomete várias culturas de interesse econômico.

Introdução

Micro-organismos endofíticos ou endófitos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, aparentemente sem causar danos a seus hospedeiros. Podem ser utilizados no controle de doenças causadas por bactérias, fungos e nematóides, uma vez que colonizam um habitat semelhante ao ocupado por estes patógenos e que também podem ativar o sistema de defesa da planta, aumentando assim a resistência desta contra fitopatógenos. Fungos endofíticos podem sintetizar metabólitos secundários com várias atividades químicas e biológicas, apontando um grande potencial desses micro-organismos como fontes de novos compostos

e produtos naturais, tendo apresentado resultados promissores com potencial como antimicrobiano, antifúngico, larvicida, antioxidante, anticâncer, antidiabético, imunossupressor, inibidor de acetilcolinesterase, entre outras propriedades, inclusive no auxílio ao crescimento e transformações genéticas em plantas.

Considerando as aplicações biotecnológicas de fungos endofíticos e seus metabólitos secundários, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antagonista *in vitro* de fungos endofíticos, isolados da planta *Justicia brandegeana* Wash. & Smith e, atividade antifúngica de seus extratos brutos de metabólitos secundários contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp..

Materiais e métodos

As linhagens de fungos endofíticos Jb224 e Jb252, isoladas de folhas de *Justicia brandegeana*, e o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. utilizados neste trabalho, pertencem 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 *Colletotrichum* sp. foi realizada a técnica de cultura pareada (CAMPANILE et al., 2007) com modificações. Discos de 6 mm 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: $Im\% = 100 \times (1 - MT/MC)$, 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 foi utilizado como solvente orgânico destilado o acetato de etila (EtOAc) 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 a avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos de metabólitos, discos (6 mm de diâmetro) do micélio da colônia do

fitopatígeno *Colletotrichum* sp. previamente crescido foram inoculados em placa de Petri e, em posição oposta com 4 cm de distância, foi colocado um disco de papel filtro autoclavado (5 mm de diâmetro), onde inoculou-se 10 µL dos extratos brutos de metabólitos nas concentrações de 10 mg.mL⁻¹ e 30 mg.mL⁻¹, diluídos em metanol. No controle positivo foi utilizado o fungicida Benlate®, na concentração de 10 mg.ml⁻¹ e, no negativo apenas metanol. As placas foram incubadas à 28°C durante 7 dias. O teste foi realizado em triplicata. Foi realizado o cálculo do índice de inibição (Im%), bem como a análise estatística conforme descrito anteriormente.

Resultados e Discussão

No teste de cultura pareada, observou-se que o fungo endófito Jb252 apresentou o maior índice de inibição contra o fitopatígeno *Colletotrichum* sp. (47,5%) e, ambos os endófitos demonstraram ser estatisticamente eficazes quando comparados ao controle (Tabela 1). Pode-se observar também que os fungos endófitos Jb224 e Jb252 apresentaram inibição de crescimento por contato micelial, classificando-se como interação competitiva do tipo A, segundo a escala de Badalyan et al. (2002).

Tabela 1– Teste de antagonismo de fungos endófitos (Jb224 e Jb252) isolados de *J. bradegeana* contra o fitopatígeno *Colletotrichum* sp.

Linhagens	Média do crescimento micelial*	Im%**
Jb224	30,773 a	45,6
Jb252	29,649 a	47,5
<i>Colletotrichum</i> sp.	56,524 b	-

*Área de crescimento do fitopatígeno, em cm² seguido pelos grupos estatísticos obtidos pelo teste de Scott-Knott (p>0,05). **Índice de inibição percentual (Im%).

Na avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos de metabólitos contra o fitopatígeno *Colletotrichum* sp., verificou-se que o extrato da linhagem Jb224 apresentou o maior índice de inibição com 7,635% na concentração de 10 mg.mL⁻¹. Porém, os tratamentos com os metabólitos secundários das linhagens Jb224 e Jb252 se enquadram no mesmo grupo estatístico do controle com metanol (Figura 1, Tabela 2). Assim, o uso destes endófitos mostrou-se efetivo contra o fitopatígeno *Colletotrichum* sp., mas seus extratos brutos de metabólitos secundários não apresentaram efeito significativo no controle desse fitopatígeno.



Figura 1 – Atividade antifúngica dos extratos brutos de metabólitos secundários de fungos endófitos contra *Colletotrichum* sp.: Controle Metanol (A); Extrato de Jb224 a 10 mg.mL⁻¹ (B) e 30 mg.mL⁻¹ (C); Extrato de Jb252 a 10 mg.mL⁻¹ (D) e 30 mg.mL⁻¹ (E).

Tabela 2 – Teste de atividade antifúngica dos extratos brutos de metabólitos secundários de fungos endofíticos (Jb224 e Jb252) isolados de *J. brandegeana* contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp.

Tratamentos	Média do crescimento micelial*	Im%**
Jb224 – 10 mg.mL ⁻¹	45,11 b	7,63
Jb224 – 30 mg.mL ⁻¹	45,73 b	6,35
Jb252 – 10 mg.mL ⁻¹	45,38 b	7,08
Jb252 – 30 mg.mL ⁻¹	46,65 b	4,47
Controle metanol	48,84 b	-
Controle fungicida Benlate	36,75 a	24,74

*Área de crescimento do fitopatógeno, em cm² seguido pelos grupos estatísticos obtidos pelo teste de Scott-Knott (p>0,05). **Índice de inibição percentual (Im%).

Muitos trabalhos vêm sendo realizados no âmbito de isolar e identificar fungos endofíticos com atividade antimicrobiana e seus metabólitos secundários, a fim de produzir novos compostos bioativos para uso biotecnológico em diversos setores industriais. Nesse contexto, este estudo contribui para o desenvolvimento e implementação de estratégias de manejo que visam diminuir a agressão ao meio ambiente, procurando assim meios para diminuir o uso excessivo de defensivos químicos em plantas cultivadas pelo homem, que é uma das principais preocupações da saúde pública.

Conclusões

Fungos endofíticos Jb224 e Jb252 de *Justicia brandegeana* possuem capacidade de inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp., além de produzirem compostos com atividade antifúngica também contra este fitopatógeno, podendo ser uma alternativa biológica e sustentável para o controle deste fitopatógeno que acomete várias culturas de interesse econômico. Assim, estudos como este são extremamente importantes para se conhecer e verificar a aplicabilidade dos endófitos e de seus produtos.

Agradecimentos

Ao CNPq e UEM.

Referências

- 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.