

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS METABÓLICOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Diaporthe* sp. ASSOCIADOS A *Pachystachys lutea* CONTRA *Sclerotinia sclerotiorum*

João Gabriel Dumont Negrelli (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ana Paula Ferreira (UEM), João Arthur do Santos de Oliveira (UEM), Cíntia Zani Fávaro Polonio (UEM), João Alencar Pamphile (Orientador), e-mail: japamphile@uem.br.

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

Área e subárea: Multidisciplinar; Biotecnologia.

Palavras-chave: Micro-organismos endofíticos. Extratos metabólicos. Difusão em ágar.

Resumo:

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é considerado um dos patógenos mais prejudiciais no mundo, ocasionando grandes perdas na produtividade agrícola. Os fungos endofíticos são fontes promissoras de uma gama de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas. Neste trabalho, objetivamos avaliar a capacidade antifúngica de extratos brutos de metabólitos secundários de fungos endofíticos *Diaporthe schini* PL40 e *D. anacardii* PL01 isolados de *Pachystachys lutea* contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Os extratos metabólicos foram obtidos a partir do meio fermentado empregando os solventes orgânicos Acetato de Etila e Hexano. A atividade antifúngica dos extratos contra o patógeno foi avaliada por meio da técnica de difusão em ágar. No teste da atividade antifúngica dos extratos, constatou-se que o extrato metabólito da linhagem endofítica *D. anacardii* PL01 apresentou resultado significativo na inibição do fitopatógeno quando extraído com acetato de etila (31,7%), quando comparados estatisticamente com a fração hexânica do mesmo isolado, com as frações acetato de etila e hexânica do isolado *D. schini* PL40 e com os controles fungicida Benlate (50.2%), metanol (2%) e fitopatógeno (0%). Diante desta perspectiva, acredita-se que os fungos do gênero *Diaporthe* são uma fonte promissora de metabólitos secundários com atividade antifúngica.

Introdução

Micro-organismos endofíticos, fungos ou bactérias, vivem no interior das plantas sem causar danos (AZEVEDO, 1998). Estes micro-organismos são capazes de exercer antagonismo contra outros microrganismos patogênicos, como por exemplo, por meio da produção de metabólitos secundários.

Já foram abordados diferentes trabalhos em relação às atividades antagônicas de isolados endofíticos contra diferentes fitopatógenos. Ribeiro et al. (2018) isolou fungos do gênero *Diaporthe* da planta *Pachystachys lutea*. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo-branco, está relacionado à grandes perdas na produtividade agrícola. Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho

foi avaliar a capacidade antifúngica dos extratos brutos de metabólitos secundários dos fungos endofíticos PL01 (*Diaporthe anacardii*) e PL40 (*Diaporthe schini*) isolados de *Pachystachys lutea* contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*

Material e Métodos

As linhagens de endofíticos utilizadas neste trabalho foram isoladas de *Pachystachys lutea* (RIBEIRO et al., 2018) e pertencem a Coleção de Micro-organismos Endofíticos e do Ambiente (CMEA) do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (Universidade Estadual de Maringá). Para a obtenção dos extratos brutos de metabólitos secundários dos dois isolados endofíticos, discos de 5 mm de diâmetro das colônias fúngicas crescidas previamente em meio BDA (Batata Dextrose Ágar, pH 6.6), foram transferidas para erlenmeyers contendo meio BD (Batata-Dextrose, pH 6.8), sendo incubados sem agitação por 21 dias. A extração do meio fermentado empregando os solventes orgânicos Acetato de Etila e Hexano, ocorreu como descrito por Polonio et al. (2015).

Para avaliar a atividade antifúngica dos extratos de metabólitos dos fungos endofíticos, o fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi crescido previamente em meio BDA durante 7 dias à 28º C. Discos de 5 mm de diâmetro da colônia do fitopatógeno e de papel filtro autoclavado com 10 µL dos extratos brutos na concentração de 10 µL/mL, foram inoculados em polos opostos de placas de Petri, contendo meio BDA, à distância de 4 cm. O teste foi realizado em quintuplicata, bem como o controle com o fitopatógeno contra discos com metanol, controle do fitopatógeno contra o fungicida comercial Benlate e controle apenas do fitopatógeno em um dos polos da placa. As placas foram incubadas por 7 dias a 28º C. O índice de inibição (Im%) do crescimento micelial do patógeno seguiu a metodologia proposta por Polonio et al. (2015). Todos os dados obtidos foram submetidos à ANOVA (Análise de Variância) empregando o teste de Scott Knott com $p < 0,05$, usando o programa SISVAR.

Resultados e Discussão

No teste da atividade antifúngica dos extratos, constatou-se que o extrato metabólito da linhagem endofítica *D. anacardii* PL01 apresentou resultado significativo na inibição do fitopatógeno quando extraído com acetato de etila (31,7%), quando comparados estatisticamente por meio da ANOVA ($p < 0,05$) com a fração hexânica do mesmo isolado, com as frações acetato de etila e hexânica do isolado *D. schini* PL40 e com os controles fungicida Benlate (50,2%), metanol (2%) e fitopatógeno (0%) (Tabela 1, Figura 1). Na literatura são reportados trabalhos da atividade antifúngica de diferentes espécies de *Diaporthe*. Chowdhary e Kaushik (2015) realizaram o isolamento e prospecção de metabólitos secundários do fungo endofítico *D. phaseolorum*. O seu extrato bruto extraído com o solvente acetato de etila foi avaliado contra *S. sclerotiorum*. Os autores obtiveram resultados de inibição com 5,22 mg.mL⁻¹ (IC₅₀).

Tabela 1. Atividade antifúngica *in vitro* de extratos brutos de metabólitos secundários de *Diaporthe anacardii* e *Diaporthe schini* contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

Linhagem	Média do crescimento micelial (cm ²)	Taxa de inibição (Im%)
Controle apenas fitopatógeno	57,11	0 _d
Controle fungicida Benlate*	28,44	50,2 _a
Controle Metanol	58,19	2 _d
Extrato Controle – Acetato de Etila **	55,89	2,1 _d
Extrato Controle – Hexano**	58,89	0 _d
<i>Diaporthe anacardii</i> PL01- Acetato de Etila	38,99	31,7 _b
<i>Diaporthe anacardii</i> PL01 – Hexano	55,80	2,3 _d
<i>Diaporthe schini</i> PL40- Acetato de Etila	46,73	18,2 _c
<i>Diaporthe schini</i> PL40- Hexano	53,42	6,5 _d

*Fungicida na concentração de 50 mg.mL⁻¹

** Extrato Controle = extração controle realizada do meio de cultura BD.

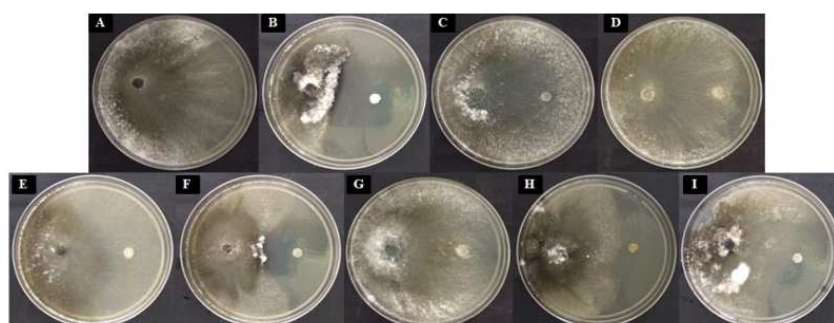


Figura 1. Atividade antifúngica *in vitro* de extratos brutos de metabólitos secundários. **A.** Controle apenas com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. **B.** Fitopatógeno (esquerda) contra o fungicida Benlate (direita). **C.** Fitopatógeno (esquerda) contra o metanol (direita). **D.** Solvente Acetato de etila. **E.** Solvente Hexano. **F.** Extrato bruto de acetato de etila *D. anacardii* PL01. **G.** Extrato bruto de hexano *D. anacardii* PL01. **H.** Extrato bruto de acetato de etila *D. schini* PL40. **I.** Extrato bruto de hexano *D. schini* PL40.

Os resultados de atividade antifúngica foram significativos na fase acetato de etila para as duas linhagens. Com isso, pode-se sugerir que compostos com esta atividade são mais facilmente extraídos empregando-se este solvente, quando comparado com o solvente hexano. Resultados semelhantes foram encontrados por Kumar e Kaushik (2013) avaliando extratos em acetato de etila e hexano contra *S. sclerotiorum*. Os autores relatam que na extração com acetato de etila, a ação antifúngica dos extratos variou de 51% a 71%. Já em fração hexânica apresentou-se menos efetiva, variando de 10% a 66%.

Conclusão

Os metabólitos secundários produzidos pelos dois endófitos empregados neste trabalho sugerem propriedades antifúngicas contra *S. sclerotiorum*, notadamente o extrato em acetato de etila da linhagem PL01 (*D. anacardii*). Diante desta perspectiva, acredita-se que os fungos do gênero *Diaporthe* são uma fonte promissora de metabólitos com atividade antifúngica, que podem ser empregados agroindustrialmente, no controle de doenças e pragas.

Agradecimentos

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

Referências

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. IN: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998, p. 117-137.

CHOWDHARY, K.; KAUSHIK, N. Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. **PLOS One**, v.10, n.11, p. 01-25, 2015.

KUMAR, S.; KAUSHIK, N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0056202.

POLONIO, J. C.; ALMEIDA, T. T.; GARCIA, A.; MARIUCCI, G. E. G.; AZEVEDO, J. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.3, p.7297-7309, 2015.

RIBEIRO, A. S.; POLONIO, J. C.; COSTA, A. T.; DOS SANTOS, C. M.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospection of culturable endophytic fungi associated with the ornamental plant *Pachystachys lutea*. **Current Microbiology**, v.75, n.5, p. 588-596, 2018, DOI: 10.1007/s00284-017-1421-9.