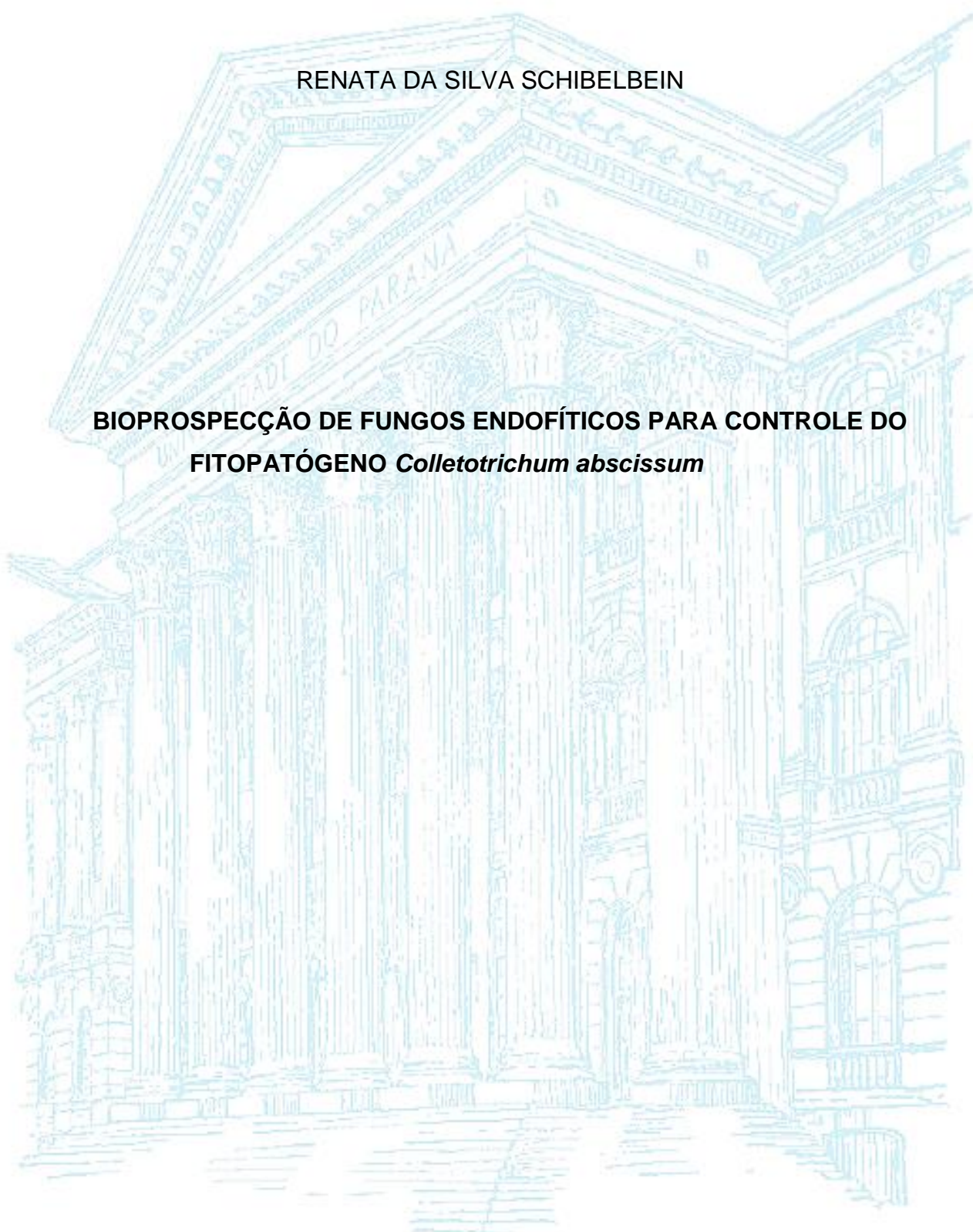


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA DA SILVA SCHIBELBEIN

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA CONTROLE DO
FITOPATÓGENO *Colletotrichum abscissum***



CURITIBA

2018

RENATA DA SILVA SCHIBELBEIN

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA CONTROLE DO
FITOPATÓGENO *Colletotrichum abscissum***

Monografia apresentada como critério parcial de avaliação da disciplina Estágio Supervisionado em Biologia - BIO028, do Curso de Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Professora. Dra. Chirlei Glienke

CURITIBA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

RENATA DA SILVA SCHIBELBEIN

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA CONTROLE DO FITOPATÓGENO *Colletotrichum abscissum*.

Monografia aprovada como requisito parcial à obtenção do título de graduado em Ciências Biológicas - Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Chirlei Glienke (Orientadora) Departamento de Genética - UFPR

Profa. Dra. Daniela Gradia Departamento de Genética - UFPR

Dra. Daiani Cristina Savi Departamento de Genética- UFPR

Curitiba, 26 de junho 2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus por guiar meus caminhos e cuidar de minha vida com amor. À minha orientadora Profª Drª. Chirlei Glienke por permitir a realização desse trabalho e além disso, por todo seu ensinamento, carinho e paciência comigo.

À professora Drª Yvelise Maria Possiede por todo gentil auxílio e apoio no campo e também por permitir o uso de seu laboratório durante o isolamento.

À minha banca Profª Drª. Daniela Gradia e Drª Daiani C. Savi por aceitarem realizar a avaliação de minha monografia.

Às amigas e colegas de laboratório Jucélia Iantas e Beatriz Assad, muito obrigada por estarem comigo e por me ajudarem na elaboração deste trabalho, sem vocês não seria possível.

À todos os amigos do LabGeM, Kariman, Daiani, Bruno, Sandrielle, Desirrê, Ana Paula, Mirrian, Alícia, Carol, Guilherme e Gustavo, obrigada pela amizade e por me ajudarem com minhas dúvidas.

À minha família amada por todo o carinho, apoio, incentivo, pelos conselhos e exemplos de união e persistência.

Ao meu querido Eduardo Henrique por acreditar em mim, por estar comigo em todos os momentos e por tornar minha vida mais leve.

Aos meus amigos da graduação Carolina, Lucas, Rafael, Fernanda, Mariana, Luana, Mayara e Jaqueline, obrigada por estarem comigo e por proporcionarem muitos momentos agradáveis e divertidos.

E a todos os demais amigos e professores que colaboraram de alguma forma para a minha formação acadêmica e pessoal.

“Na vida não há nada a se temer,
apenas a ser compreendido”

Marie Curie

RESUMO

Na busca de novos compostos de interesse biotecnológico destaca-se a bioprospecção de microrganismos endofíticos. Esses organismos podem ser fungos ou bactérias que se associam às espécies vegetais e não causam doença em seu hospedeiro, além disso, muitos possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários. Sabe-se ainda que a probabilidade de isolar uma nova espécie endofítica que produza compostos de interesse é aumentada em nichos ecológicos pouco explorados. Nesse contexto, foi realizada a bioprospecção de fungos endofíticos de folhas e pecíolos das plantas medicinais *Vochysia divergens* e *Stryphnodendron adstringens*, encontradas no pantanal e no cerrado, respectivamente, sendo essas regiões detentoras de altos índices de endemismo e de biodiversidade. Foram isolados 1304 fungos que foram reunidos em 159 morfogrupos, totalizando uma frequência de isolamento de 66,62%. Após essa etapa foram selecionados 20 indivíduos (de morfogrupos diferentes) para produção de extratos e avaliação antifúngica frente ao fitopatógeno *Colletotrichum abscissum*, causador da queda prematura de flores e frutos em citros (QPFC). Realizando o teste com os extratos foi possível perceber uma redução do crescimento do fungo *C. abscissum* em comparação com o controle negativo em todos os extratos testados, entretanto, destacou-se a atividade antifúngica do isolado 67. Os extratos desse isolado promoveram redução significativa (71,7%) do crescimento micelial de *C. abscissum*, sendo essa atividade inclusive superior a apresentada pelo fungicida Derosal® (53,78%) utilizado no tratamento de doenças que acometem as partes aéreas nas culturas de citros.

Palavras-chave: *V. divergens*, *S. adstringens*, Antifúngico, Metabólitos secundários, bioprospecção.

ABSTRACT

In the search of new compounds of biotechnology interest, highlight the bioprospecting of endophytic microorganisms. These organisms can be fungus or bacteria that are associated with plant species without causing any disease to the host, moreover some of them can produce secondary metabolites. In addition, the probability of isolating new species that produce new compounds is increased in little explored ecological niches. Thus, we performed the bioprospecting of endophytic fungi of leaves and petioles of the medicinal plants *Vochysia divergens* and *Stryphnodendron adstringens*. These plants are found in Pantanal and Cerrado biomes in Brazil, characterized by regions with high rates of endemism and biodiversity. A total of 1304 fungi were isolated and clustered into 159 morphotypes with an isolation frequency of 66.62%. After this stage, 20 individuals (from different morphotypes) were selected for the production of extracts and antifungal evaluation against the phytopathogen *Colletotrichum abscissum*, the epidemiological agent of Postbloom fruit drop (PFD) in citrus. The extracts tested showed a reduction *C. abscissum* mycelial growth compared to the negative control in all tested extracts. However, the antifungal activity of the isolate 67 was highlighted. Extracts from this isolate promoted a significant reduction (71,1%) of the mycelial growth fo *C. abscissum*, and this activity is even superior to that presented by the fungicide Derosal (53,78%) used in the treatment of citrus diseases in citrus

Key words: *V. divergens*, *S. adstringens*, antifungal, secondary metabolites, bioprospecting.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: A) <i>VOCHYSIA DIVERGENS</i> B) <i>STRYPHODENDRON ADSTRINGENS</i>	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 2: MAPA DOS PONTOS DE COLETA.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 3: PLACAS COM MEIO BDA E ÁCIDO NALIDÍXICO CONTENDO CINCO FRAGMENTOS DE <i>V. DIVERGENS</i>	14
FIGURA 4: PLACA COM MEIO BDA E AO CENTRO O DISCO MICELIAL DE <i>C. ABSCISSUM</i>	17
FIGURA 5: ASPECTO MORFOLÓGICO DOS FUNGOS ISOLADOS.	19
FIGURA 6: CRESCIMENTO MICELIAL (CM) DE <i>Colletotrichum abscissum</i> APÓS XX DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA CONTENDO XX UL DE EXTRATOS DE 20 ENDÓFITOS.	21
FIGURA 7: RESULTADO DO TESTES DOS EXTRATOS CRESCIMENTO DO <i>COLLETOTRICHUM ABSCISSUM</i>	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO. 2

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ISOLADO CONTENDO SEU CÓDIGO, PLANTA E TECIDO DO QUAL FOI OBTIDO E NÚMERO TOTAL DE ENDÓFITOS PRESENTES NO MORFOGRUPO E PLANTA DE ORIGEM.....	16
TABELA 2 - TOTAL DE ISOLADOS E FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE FOLHAS E PECÍOLOS DAS PLANTAS <i>V. DIVERGENS</i> E <i>S. ADSTRINGENS</i>	18
TABELA 3 - TAXA DE CRESCIMENTO DO <i>Colletotrichum abscissum</i>	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS	12
2	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO	13
2.2	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	14
2.3	COLÔNIA MONOSPÓRICA.....	15
2.4	PRODUÇÃO DE EXTRATOS	15
2.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	16
3	RESULTADOS	18
3.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	18
3.2	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A <i>COLLETOTRICHUM ABSCISSUM</i>	18
4	DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÃO	26
	REFERÊNCIAS	27
	APÊNDICE 1 – RESULTADO DA TAXA DE CRESCIMENTO DO <i>C. abscissum</i> ..	30
	APÊNDICE 2 – RESULTADO TESTE TUKEY	31
	APÊNDICE 3 – RESULTADO ANOVA	32

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade Brasileira é considerada uma das mais ricas do mundo, sendo que o Centro de Monitoramento de Conservação Ambiental da ONU colocou o Brasil na lista dos 17 países com maior biodiversidade. O Brasil possui entre 15% a 20% das 1,5 milhões de espécies conhecidas em todo o planeta. Essa diversidade é decorrente da ampla extensão do Brasil e por suas diversas condições geográficas e climáticas, resultando em seis diferentes biomas. Segundo Forzza e colaboradores (2010) existem cerca de e 40.989 espécies de plantas e fungos no Brasil, das quais 18.932 (46,2%) são endêmicas do país.

Além da rica biodiversidade, o Brasil é dotado de inúmeros conhecimentos tradicionais, nos quais é comum o uso de plantas para fins medicinais. Entretanto termo bioprospecção surgiu apenas no final do século XX, para cunhar o uso da biodiversidade com objetivo de se explorar recursos genéticos e substâncias bioquímicas comerciáveis (LAIRD, 2002) e tem sido muito aplicado para exploração de plantas medicinais e microrganismos associados. Portanto, a bioprospecção é uma forma de se extrair valor econômico da biodiversidade com a busca de enzimas, compostos, genes ou metabólitos com potencial farmacêutico ou industrial (SACCARO JÚNIOR, 2011).

Entre a busca de novos compostos de interesse destaca-se a bioprospecção de microrganismos endofíticos, sendo eles fungos ou bactérias que habitam, geralmente, as partes aéreas de plantas (AZEVEDO,1998). Essa relação ecológica microrganismo-planta pode ser comensal, não refletindo em efeito direto ao hospedeiro, ou ainda pode ser simbiote mutualística, em que os endófitos auxiliam as plantas no crescimento ou no controle de patógenos (AZEVEDO,1998). Sabe-se ainda que os endófitos são capazes de produzir metabólitos secundários como toxinas, antibióticos, antifúngicos e fatores de crescimento de grande interesse biotecnológico (CHAPLA et al., 2013).

De acordo com Conti e colaboradores (2012) os metabólitos secundários produzidos por endófitos podem estar associados com a planta hospedeira por resultado de transferência genética durante a fase evolutiva. No trabalho de Stierle e autores (1993) foi isolado um microrganismo endofítico capaz de produzir taxol igualmente à planta hospedeira *Taxus brevifolia*. Já no trabalho de Dos Santos e

colaboradores (2016) foi demonstrado o poder antifúngico frente ao fitopatógeno *Phyllosticta Citricarpa* a partir de extratos provenientes de endófitos isolados.

Além disso, sabe-se que a probabilidade de isolar uma nova espécie produtora de novos compostos é aumentada pelo estudo em nichos ecológicos pouco explorados (SCHULZ et al. 2002). Neste sentido, o Pantanal representa um bioma pouco estudado e de alta biodiversidade, caracterizando-se por inundações sazonais de suas planícies. No período de cheia a região se torna uma das maiores extensões úmidas contínuas do planeta e devido sua rica biodiversidade é considerada pela UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura) um Patrimônio Natural Mundial. Esse bioma possui extensão de 137 mil km², ocupando a parte sul do Mato Grosso e a porção noroeste do Mato Grosso do Sul (LINHARES e GEWANDSZNAJDER, 1998). Já o Cerrado, de acordo com dados do Ministério do Meio Ambiente-MMA, é a savana mais rica em biodiversidade do mundo e possui alto nível de endemismo, o que coloca a região na lista dos *hotspots* para a conservação. Além disso, é o segundo maior bioma do Brasil, totalizando 2.036.448 km². Entretanto o cerrado é considerado o segundo bioma mais degradado do Brasil, onde apenas 2,2% da sua área encontra-se legalmente protegida (KLINK e MACHADO, 2005). Logo, as rápidas expansões agrícolas e pecuaristas levam a um alto índice de degradação e colocam em risco a biodiversidade desse bioma e todo o seu potencial ainda não conhecido.

A fim de associar valor a biodiversidade encontrada nesses dois biomas, a exploração do potencial biotecnológico de endófitos associados a plantas medicinais é uma alternativa. Foram selecionadas duas plantas utilizadas na medicina popular, *Vochysia divergens* e *Stryphnodendron adstringens* (Figura 1). *Vochysia divergens* (Vochysiaceae) conhecida popularmente como cambará, é encontrada no Pantanal sul mato-grossense e é utilizada por comunidades tradicionais no tratamento de asma e de infecções (HESS e MONACHE, 1999). Em 2015, Savi e colaboradores relataram atividade antitumoral, antioxidante e antibiótica de extratos produzidos a partir do cultivo de endófitos da planta *V. divergens*. Também a partir desse hospedeiro foi isolada uma nova espécie fúngica, *Phaeophleospora vochysiae*, a qual produziu um novo composto com elevada atividade antimicrobiana e baixo nível de citotoxicidade (SAVI et al, 2018).

FIGURA 1: *Vochysia divergens* E *stryphnodendron adstringens*.



Figura 1 A) *Vochysia divergens* - Cedida por Sandrielle Noriler (Acervo pessoal). B) *Stryphnodendron adstringens*. Fonte: Silva Jr, 2005.

A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Fabaceae), conhecida como Barbatimão, é uma planta medicinal encontrada no cerrado e amplamente utilizada como cicatrizante, antisséptico e bactericida. Ferreira e colaboradores (2010) relataram a atividade antibacteriana do extrato da casca de *S. adstringens* contra *Staphylococcus aureus*. Carvalho e colaboradores (2012) relataram a atividade antimicrobiana e anticancerígena de dezesseis extratos de diferentes fungos endofíticos isolados da planta *S. adstringens*.

Compostos produzidos por endófitos destas e outras plantas medicinais podem ser utilizados no controle de doenças em humanos, animais e vegetais. O primeiro passo é a seleção de microrganismos com atividade biológica, seguido da otimização da produção dos compostos ativos utilizando diferentes meios e condições de fermentação. Nosso grupo de pesquisa tem realizado a prospecção de extratos contra fitopatógenos, como *Colletotrichum abscissum*, fungo filamentosos responsável pela queda prematura de flores e frutos (QPFC) ou Podridão floral dos citros (PFC) nas regiões tropicais, semi-tropicais e temperadas. Essa doença é caracterizada pela presença de lesões de coloração laranja-amarronzada nas pétalas das flores. Após a infecção, os frutos recém-formados caem e os cálices ficam aderidos ao disco floral (FEICHTENBERGER, 1994), afetando assim a produção de novos frutos (KUPPER et al, 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, pois possui cerca de um milhão de hectares plantados, nos quais são produzidos 19 milhões de toneladas de frutos anualmente (LOPES et al 2011). Entretanto, a doença causada pelo *C. abscissum* afeta negativamente a produção, refletindo em grandes perdas econômicas. Além disso, o controle da QPFC é realizado predominantemente com uso de fungicidas, que elevam o custo de produção e resultam em danos prejudiciais ao meio ambiente (KUPPER et al, 2009). Sendo assim a utilização de metabólitos secundários produzidos por linhagens endofíticas pode representar uma alternativa para o controle da doença e diminuição do uso de fungicidas.

Com base nesses dados, objetivou-se isolar e bioprospectar microrganismos endofíticos das plantas *Vochysia divergens* e *Stryphnodendron adstringens* e avaliar a atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Colletotrichum abscissum*. Esse projeto foi realizado como uma etapa inicial de seleção de endófitos produtores de compostos promissores que, posteriormente, serão testados contra outros dois fitopatógenos de relevância para a produção agrícola. Portanto, optou-se em selecionar o fungo *C. abscissum* para essa primeira parte de triagem devido seu rápido crescimento *in vitro* e sua importância econômica no Brasil.

1.1 OBJETIVOS

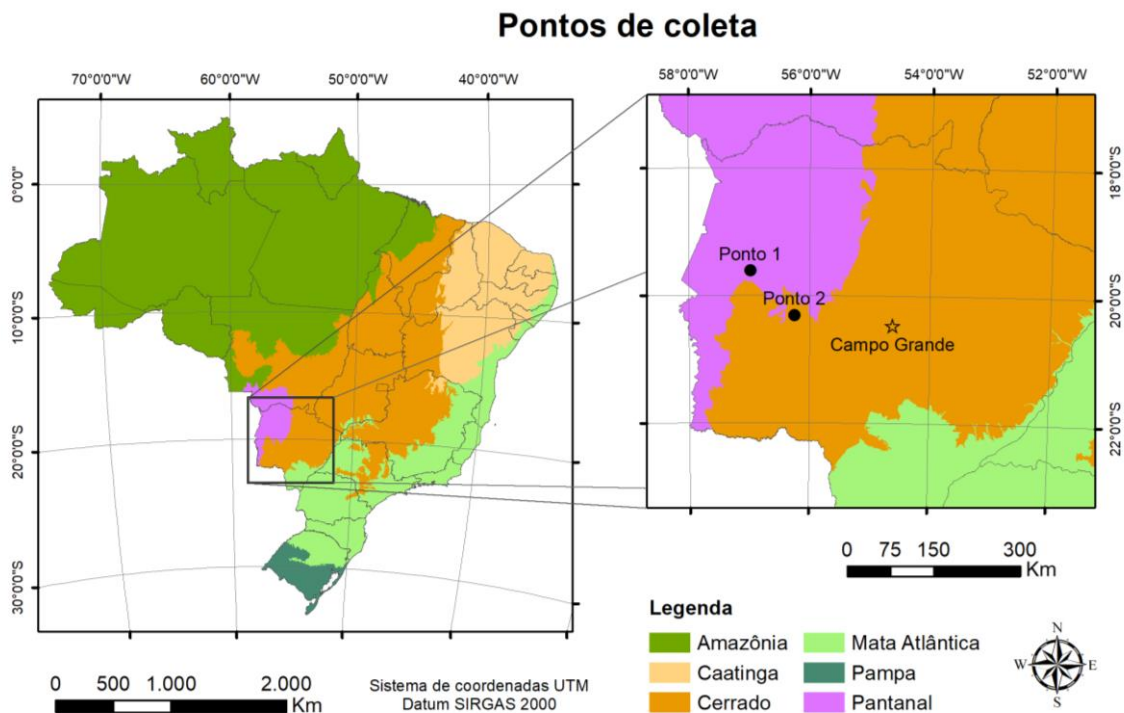
O projeto teve como objetivo o isolamento de fungos endofíticos de folhas e pecíolos das plantas *Vochysia divergens* e *Stryphnodendron adstringens*, produção de extratos e avaliação da atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Colletotrichum abscissum*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta de folhas e pecíolos de *Vochysia divergens* foi realizada no mês de janeiro de 2018, no município de Corumbá-MS, na Foz do Rio Vermelho (coordenadas UTM SIRGAS 2000/23S: 499.894/ 7.837.298) região do Pantanal sul-mato-grossense (Figura 2). As folhas e pecíolos de *Stryphnodendron adstringens* foram coletadas ao longo da BR262 na região de Miranda-MS (coordenadas UTM SIRGAS 2000/23S: 574.890/ 7.754.408, UTM), pertencente ao bioma do Cerrado (Figura 2). Para a realização do isolamento foram selecionadas 19 plantas da espécie *Vochysia divergens* (cambará) e 20 plantas de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), e dessas, foram coletadas 5 folhas sem injúrias de cada indivíduo.

FIGURA 2: MAPA DOS LOCAIS DE ESTUDO.



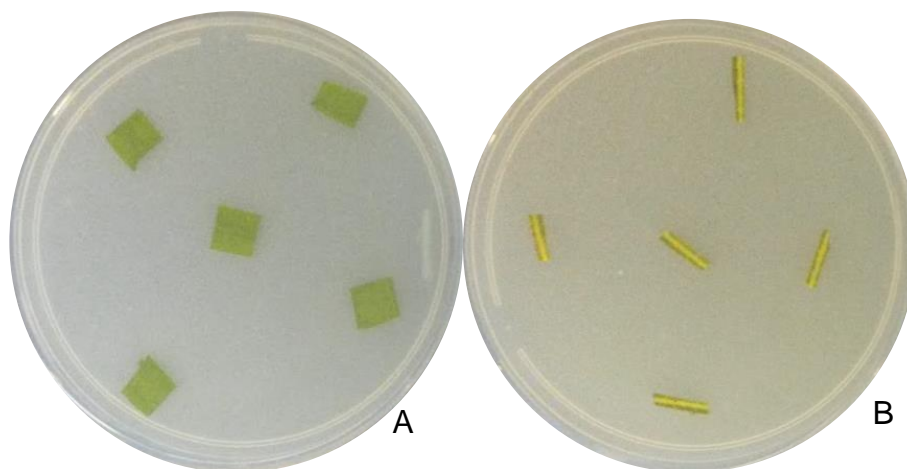
Legenda: Ponto 1: Município de Corumbá-MS (Pantanal) região da coleta dos exemplares de *Vochysia divergens*. Ponto 2: Região de Miranda-MS (Cerrado) coleta dos exemplares de *Stryphnodendron adstringens*. Fonte: Cedido por Eduardo Henrique S. B. da Silva (adaptado IBGE).

2.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

As folhas selecionadas foram higienizadas com água corrente e, posteriormente, passaram pelo processo de esterilização superficial, conforme descrito por Petrini (1986). As folhas foram imersas em água destilada por 30 segundos, em seguida mergulhadas em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% de cloro ativo durante 3 minutos, álcool 70% por 1 minuto e finalmente água destilada por 30 segundos. Após a etapa de assepsia, 5 fragmentos de aproximadamente 8mmx8mm de cada folha foram depositados em placas de Petri com meio BDA (Batata-dextrose-ágar, Merck®) contendo 50 µg/mL de ácido nalidíxico para a inibição do crescimento bacteriano. O pecíolo foi seccionado em 5 fragmentos de aproximadamente 1 cm sendo igualmente distribuídos em placas contendo BDA e antibiótico (Figura 3).

As placas foram incubadas em BOD 28°C e diariamente inspecionadas. Quando observado a presença de crescimento fúngico, o microrganismo foi repicado em frascos de penicilina contendo meio BDA. A frequência de isolamento foi calculada utilizando a fórmula: $FI = (\text{número de fungos isolados} \times \text{número de total de fragmentos amostrados}) / 100$.

FIGURA 3: PLACAS COM MEIO BDA E ÁCIDO NALIDÍXICO CONTENDO CINCO FRAGMENTOS DE *V. divergens*.



A) Fragmentos foliares B) Fragmentos do pecíolo.

Após o isolamento dos fungos endofíticos, os mesmos foram divididos em morfogrupos de acordo com características macro morfológicas como cor, aspecto da colônia, características do micélio e pigmentação solúvel no meio. Em seguida, escolheu-se um representante de cada morfogrupo para a realização da cultura monospórica.

2.3 COLÔNIA MONOSPÓRICA

A colônia monospórica foi realizada com o objetivo de obter um isolado puro proveniente de um único esporo. Para isso, foi realizado a lavagem da placa de Petri contendo a colônia fúngica com solução salina (0,85% de NaCl) para obtenção de solução de esporos com concentração de 10^6 conídios/ml. Após essa etapa, foi adicionada em placa contendo meio BDA 1ml da solução de esporos, que foi espalhada uniformemente por toda a placa com o auxílio da alça de drigalski. Assim que visualizada a formação de colônias, uma foi transferida para uma nova placa contendo BDA e utilizada para as próximas etapas.

2.4 PRODUÇÃO DE EXTRATOS

Para a produção dos extratos e posterior teste contra o fitopatógeno, foram eleitos 20 isolados (Tabela 1), selecionados devido ao aspecto morfológico da colônia distinto em comparação com os demais e pela presença de pigmentação solúvel no meio.

Um pré-cultivo dos isolados foi realizado em placas de Petri contendo meio BDA por 3 dias, a 28°C. Em seguida, para a produção de extratos, foram adicionados 3 discos de 16 mm da cultura fúngica em frascos erlenmeyers (250 mL) contendo 100 mL de meio extrato de malte (ME – Extrato de malte 20g/L, glicose 20g/L e peptona 1g/L), os quais foram incubados em shaker a 28 °C, 180 rpm, por 14 dias. Os extratos foram filtrados e na porção líquida foi adicionado 1% da resina XAD (Sigma) e mantido em rotação *overnight*. A resina foi filtrada e os metabolitos absorvidos no XAD foram extraídos com metanol (V x V) até a descoloração. O metanol foi rotaevaporado à 65°C. Por fim, os extratos secos foram pesados e diluídos em metanol em concentração de 10 mg/mL (SAVI et al., 2015).

TABELA 1 – MORFOGRUPO, CÓDIGO DOS ISOLADOS UTILIZADOS, HOSPEDEIRO E TECIDO DE ISOLAMENTO E NÚMERO DE ISOLADOS OBTIDOS EM CADA MORFOGRUPO.

Morfogrupo	Código	Planta	Tecido	Nº isolados e planta de origem
4	BTP15P5	<i>S. adstringens</i>	Pecíolo	2 (<i>S. adstringens</i>)
12	BTP2P2	<i>S. adstringens</i>	Pecíolo	3 (ambas)
14	CAP16P4	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	5 (<i>V. divergens</i>)
18	CAP13F2	<i>V. divergens</i>	Folha	26 (ambas)
25	CAP16P4	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	3 (<i>V. divergens</i>)
31	CAP16P4	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	2 (<i>V. divergens</i>)
32	CAP1P1	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	1 (<i>V. divergens</i>)
47	CAP13P5	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	1 (<i>V. divergens</i>)
55	CAP8F17	<i>V. divergens</i>	Folha	1 (<i>V. divergens</i>)
63	CAP5P1	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	1 (<i>V. divergens</i>)
67	CAP4P1	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	2 (<i>V. divergens</i>)
72	BTP14F4	<i>S. adstringens</i>	Folha	2 (ambas)
79	BTP13F4	<i>S. adstringens</i>	Folha	4 (ambas)
80	CAP16P4	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	7 (ambas)
85	CAP9P3	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	1 (<i>V. divergens</i>)
87	BTP14F2	<i>S. adstringens</i>	Folha	1 (<i>S. adstringens</i>)
94	CAP11P4	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	1 (<i>V. divergens</i>)
95	CAP13F4	<i>V. divergens</i>	Folha	1 (<i>S. adstringens</i>)
111	CAP9P2	<i>V. divergens</i>	Pecíolo	2 (<i>V. divergens</i>)
128	BTP8F4	<i>S. adstringens</i>	Folha	8 (ambas)

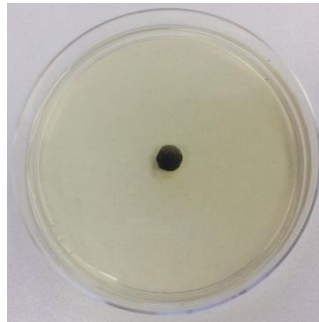
2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A linhagem de *Colletotrichum abscissum* (LGMF1258) utilizada neste trabalho foi fornecida pelo Centro APTA Citros do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, Campinas-SP, Brasil).

Para a realização dos testes, foram adicionados 100 µL do extrato disposto uniformemente por toda a superfície de placas de Petri contendo meio BDA com o auxílio da alça de Drigalski. No centro da placa foi adicionado um disco de 8mm da colônia de *C. abscissum* (Figura 4), as quais foram incubadas em BOD à 28°C por 7 dias. Como controle negativo foi utilizado o metanol e como controle positivo foi utilizado o fungicida Derosal® (5,0 mg/mL).

O experimento foi realizado em triplicada e a avaliação da atividade antifúngica foi feita comparando o crescimento dos tratamentos com os controles e os resultados foram submetidos à análise de variância paramétrica (ANOVA) em Graphpad Prims v. 6.01 e ao teste Tukey em Past 3.20.

FIGURA 4: PLACA DE PETRI COM MEIO BDA E AO CENTRO O DISCO MICELIAL DE *C. abscissum*.



3 RESULTADOS

3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Foram isolados 1304 fungos a partir de 975 fragmentos analisados, resultando em uma frequência de isolamento de 66,62% (Tabela 2), sendo 664 endófitos isolados de *Vochysia divergens* e 640 de *Stryphnodendron adstringens*. Os fungos endofíticos foram reunidos em 159 morfogrupos, dos quais apenas 47 morfogrupos foram comuns em ambas as plantas analisadas, 62 morfogrupos foram isolados exclusivamente de *S. adstringens*, enquanto 50 morfogrupos apresentaram ocorrência apenas em *V. divergens*.

TABELA 2 - TOTAL DE ISOLADOS E FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE FOLHAS E PECÍOLOS DAS PLANTAS *V. divergens* E *S. adstringens*.

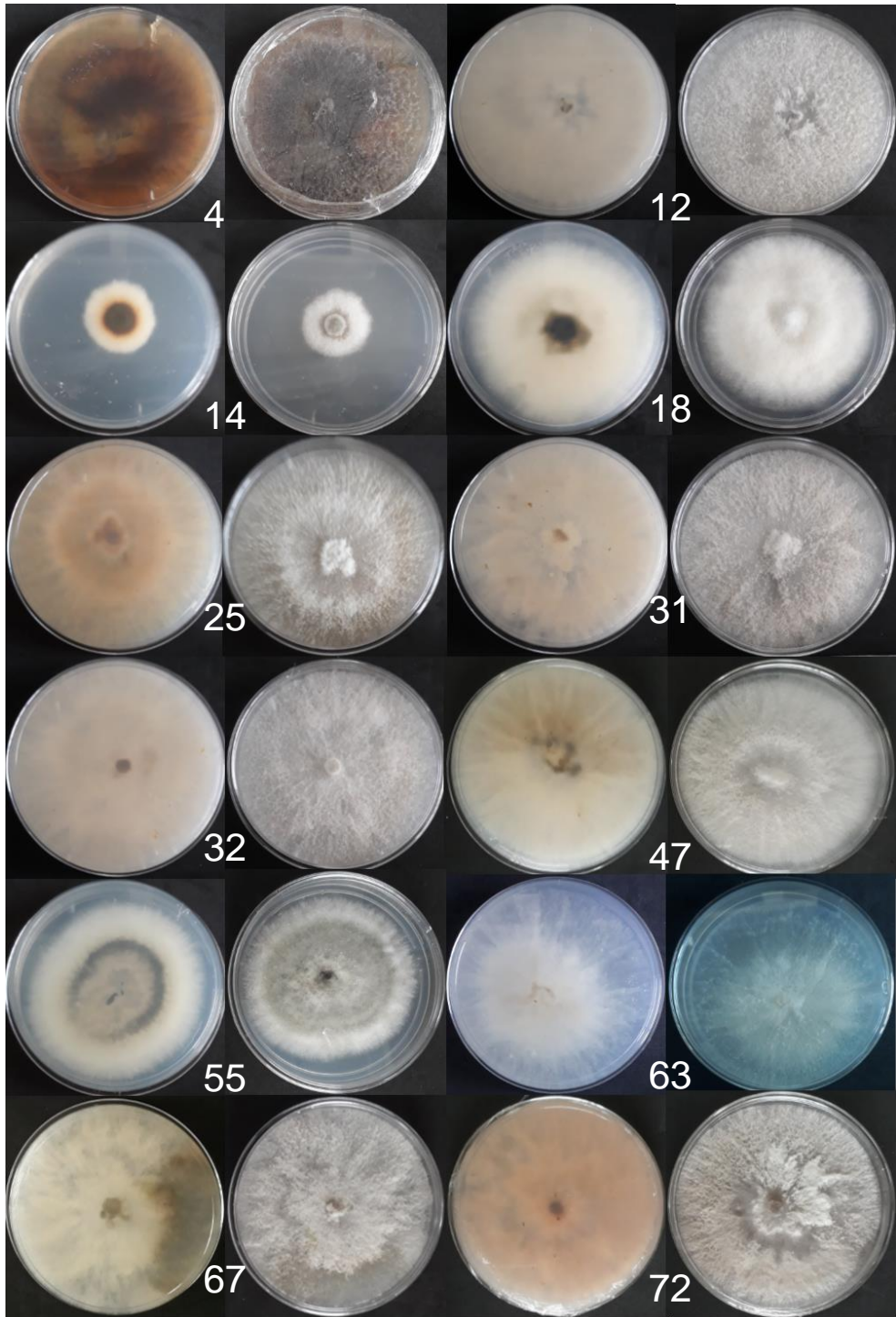
	<i>Vochysia divergens</i>		<i>Stryphnodendron adstringens</i>	
	Nº de isolados	Frequência de isolamento	Nº de isolados	Frequência de isolamento
Folhas	315	66,1%	311	62,2%
Pecíolos	349	73,47%	329	65,8%
Total	664	69,78%	640	64%

As características macromorfológicas dos 20 isolados selecionados para a produção de extrato e testes frente o fitopatógeno *Colletotrichum abscissum* podem ser observadas na Figura 5.

3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A *Colletotrichum abscissum*

Dos 20 isolados avaliados, 13 endófitos produziram extratos que reduziram significativamente o crescimento micelial do fungo *C. abscissum* (Tabela 3 e Figuras 6 e 7). Destaca-se o isolado 67, cujo extrato reduziu o crescimento micelial do fitopatógeno em 71,7%, sendo essa atividade superior inclusive ao fungicida Derosal®, que reduziu apenas 53,78% (Tabela 3).

FIGURA 5: ASPECTO MACROMORFOLÓGICO DOS FUNGOS ISOLADOS (A COLUNA DA ESQUERDA REPRESENTA O VERSO DA COLÔNIA FÚNGICA E A COLUNA DA DIREITA A FRENTE).



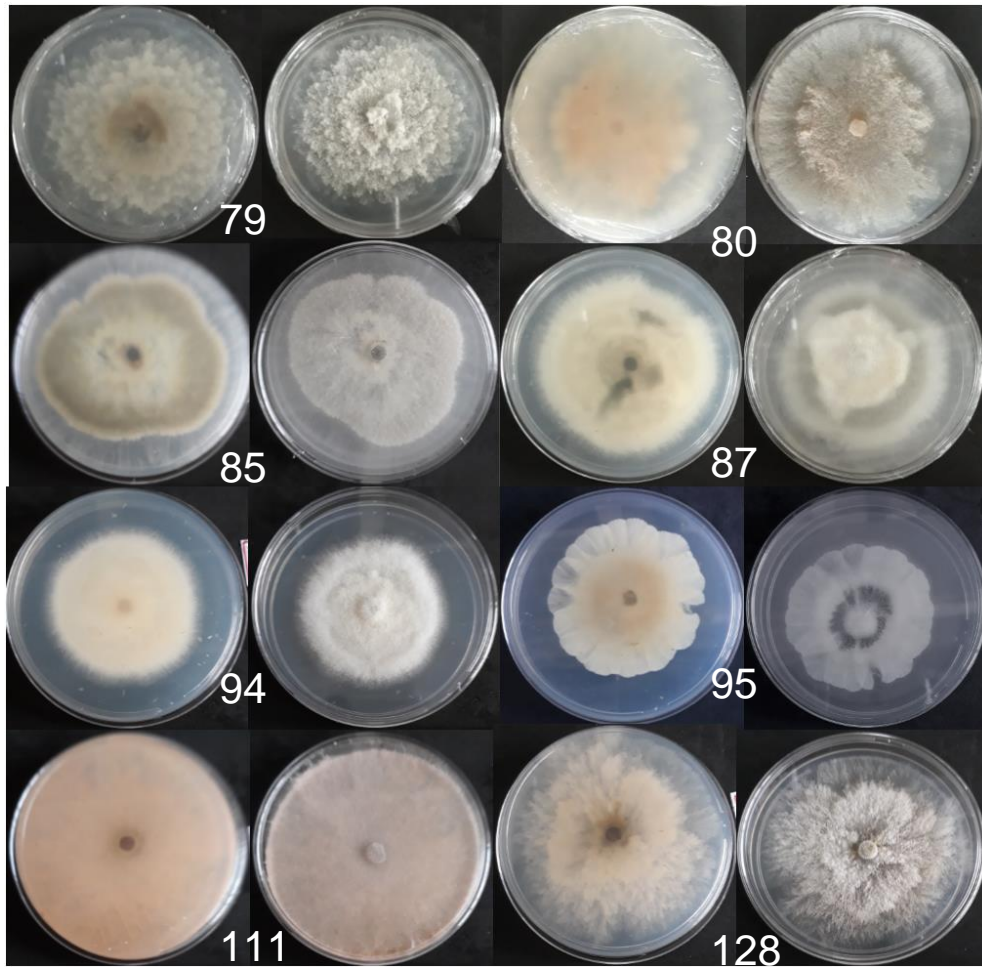


TABELA 3 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *C. abscissum* NA PRESENÇA DOS EXTRATOS PRODUZIDOS A PARTIR DO CULTIVO DE 20 LINHAGENS

ENDOFÍTICAS E CÁLCULO DA PORCENTAGEM DA INIBIÇÃO EM COMPARAÇÃO COM METANOL (CONTROLE NEGATIVO).

Nº isolado	Média	Inibição
67**	1.18 ± 0.12	71.71%
72*	2.57 ± 0.15	38.65%
128*	2.65 ± 0.10	36.65%
63*	2.68 ± 0.10	35.86%
85*	3.10 ± 0.26	25.90%
55*	3.27 ± 0.06	21.91%
14*	3.33 ± 0.31	20.32%
87*	3.37 ± 0.25	19.52%
94*	3.37 ± 0.32	19.52%
25*	3.42 ± 0.41	18.33%
12*	3.50 ± 0.09	16.33%
95*	3.53 ± 0.15	15.54%
80*	3.57 ± 0.06	14.74%
32	3.67 ± 0.13	12.35%
111	3.68 ± 0.20	11.95%
47	3.73 ± 0.12	10.76%
4	3.82 ± 0.21	8.76%
31	3.82 ± 0.03	8.76%
18	3.92 ± 0.16	6.37%
79	4.00 ± 0.10	4.38%
Metanol	4.18 ± 0.06	0.00%
Derosal	1.93 ± 0.03	53.78%

Nota: (*) indica presença de significância (valor de $\alpha < 0,05$) conforme teste Tukey em comparação com o controle negativo (Metanol). (**) indica significância a $\alpha < 0,01$.

FIGURA 6 - CRESCIMENTO MICELIAL (CM) DE *Colletotrichum abscissum* APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO BDA CONTENDO 100 μ L DE EXTRATOS DE 20 ENDÓFITOS.

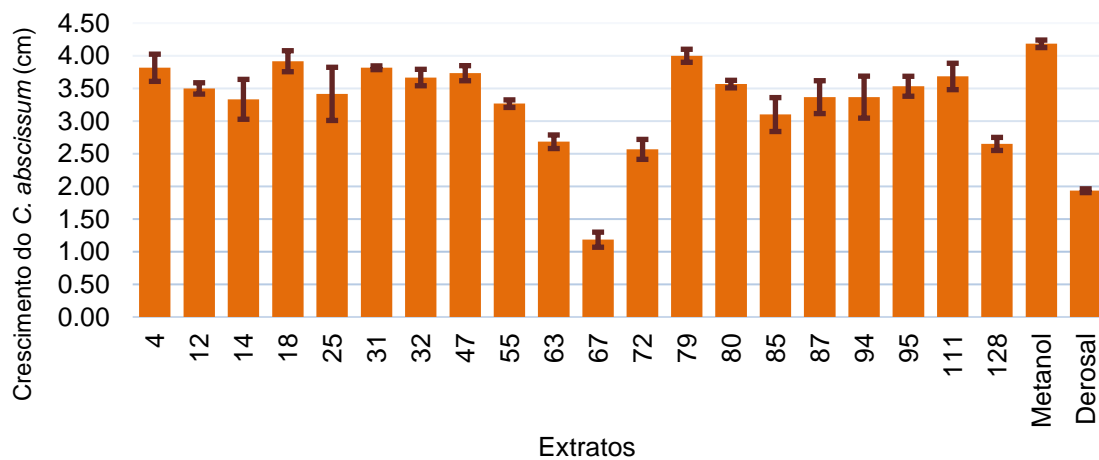
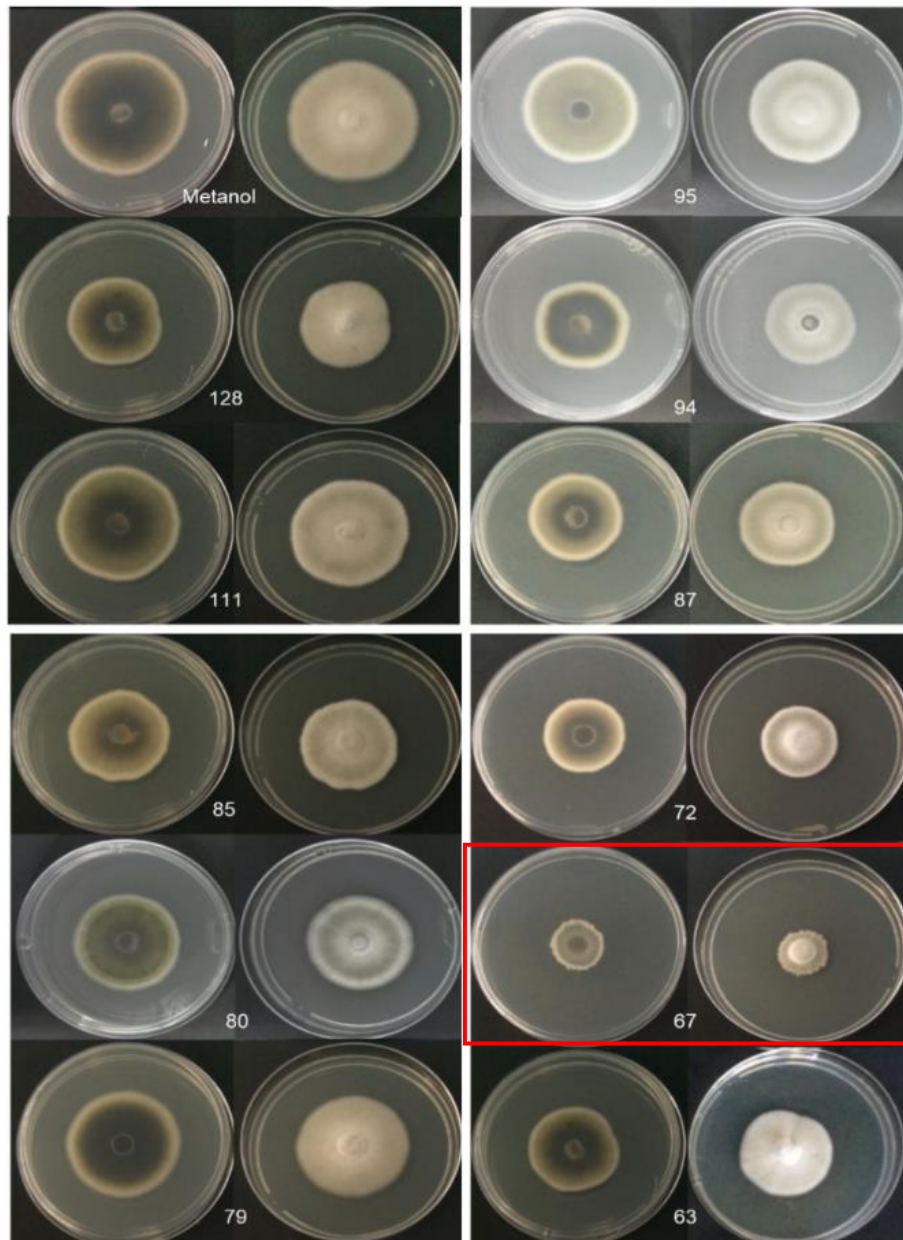
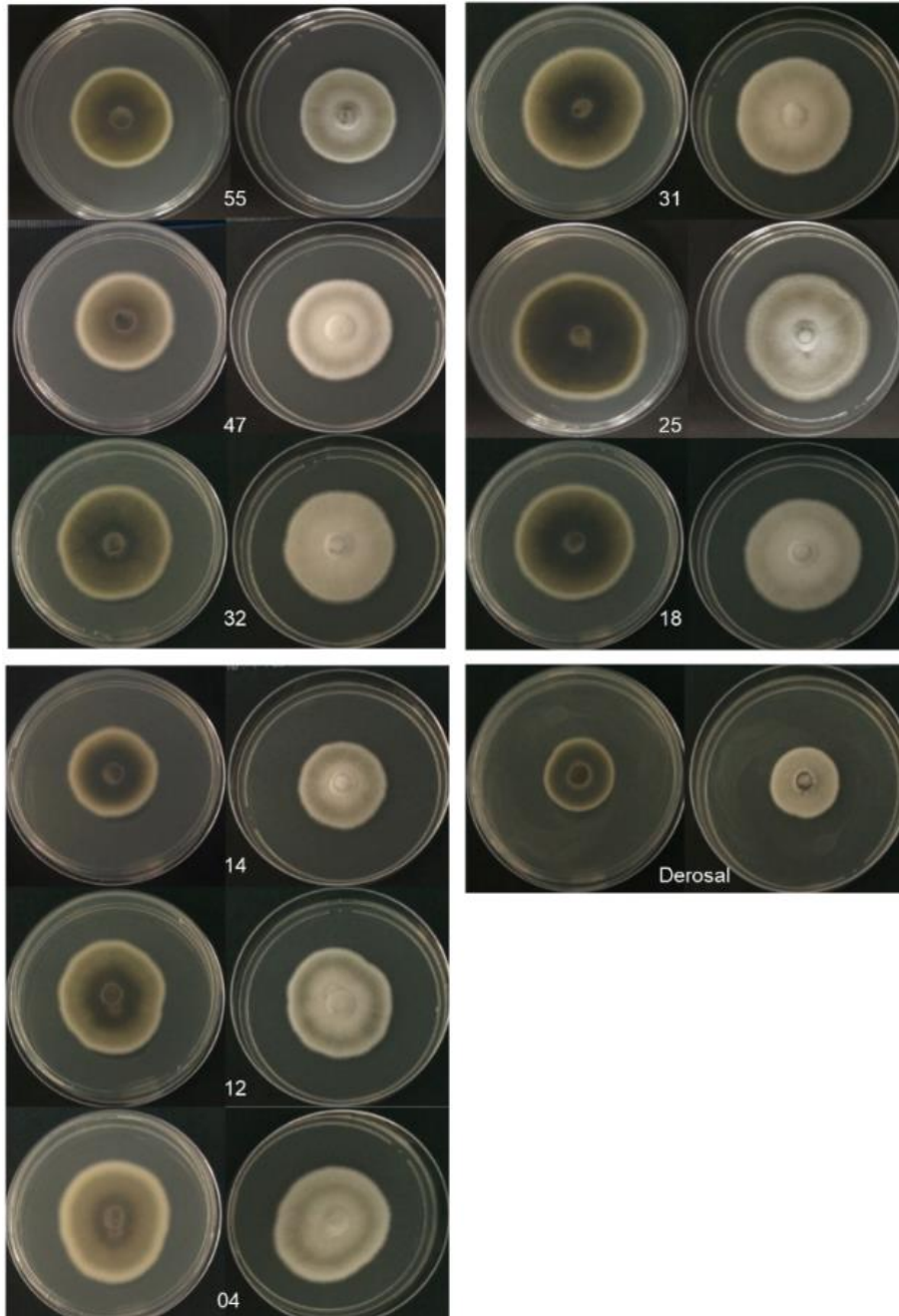


FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA FUNGO *Colletotrichum abscissum* DOS EXTRATOS PRODUZIDOS A PARTIR DO CULTIVO DE 20 ISOLADOS ENDOFÍTICOS.





Nota: Em destaque vermelho o isolado 67, o qual promoveu maior redução do crescimento do fitopatógeno. Metanol representa o controle negativo e o Derosal controle positivo.

4 DISCUSSÃO

De acordo com Banerjee (2011), as regiões tropicais e subtropicais possuem as maiores diversidades de espécies endofíticas, já que são regiões ricas em biodiversidade. As comunidades de endófitos são formadas de acordo com as características das plantas hospedeiras e conforme localização geográfica que essas plantas estão inseridas (ARNOLD, 2007). Como demonstrado nesse trabalho, 70% dos morfogrupos foram isolados exclusivamente de uma das espécies vegetais estudadas. Isso pode estar relacionado ao fato de que essas plantas ocorrem em biomas com características divergentes, e que conseqüentemente, possuem comunidades endofíticas diferentes.

Noriler et al. (2018) realizaram o isolamento de fungos endofíticos de *Vochysia divergens* e *Stryphnodendron adstringens*, relatando uma frequência de isolamento de 72% e de 49%, respectivamente. Portanto, observa-se que a frequência de isolamento de *V. divergens* no presente estudo possui valor muito próximo em comparação com o descrito anteriormente. Porém a taxa de isolamento em *S. adstringens* foi maior no presente trabalho do que no trabalho de Noriler et al. (2018). Hokama e colaboradores (2016) isolaram 77 fungos endofíticos de *Vochysia divergens* e relataram o potencial antifúngico de três isolados contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*. O presente estudo corroborou com o que consta na literatura sobre o potencial antifúngico de fungos endofíticos isolados a partir de *V. divergens*.

No estudo de Taylor e autores (2002) alguns endófitos demonstraram preferência na colonização dos tecidos vegetais. Os pesquisadores descobriram que as Xylariaceae, por exemplo, são mais comuns em folhas do que em pecíolos. E no presente trabalho, percebeu-se que dentro do morfogrupo 67 existem apenas dois endófitos, que foram obtidos a partir de pecíolos de *V. divergens*, colaborando para a hipótese que esses indivíduos possam ser raros e que possuam especificidade com relação ao tecido de ocorrência.

Estudos de comunidades de endófitos têm mostrado que eles são usualmente específicos aos hospedeiros ao nível de espécies, sugerindo que ainda existem muitos endófitos a serem isolados e sua potencialidade investigada., E com esse estudo foi possível obter endófitos com potencial antifúngico de plantas medicinais de biomas poucos explorados. Foi demonstrado ainda, grande potencial

para o isolamento de microrganismos endofíticos que produzam metabólitos secundários de interesse de *V. divergens* e *S. adstringens*.

5 CONCLUSÃO

Constata-se que, a busca por endófitos com potencial antifúngico provenientes de *Vochysia divergens* e *Stryphnodendron adstringens* demonstrou-se promissora, pois 13 dos 20 isolados analisados produziram extratos que promoveram a redução significativa do crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum abscissum*.

Perspectivas futuras:

Na continuação desse trabalho, será necessário a continuação dos testes com os demais isolados endofíticos, realizar a identificação dos microrganismos encontrados e elucidação dos metabólitos produzidos pelo endófito 67.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M. **Diversidade de fungos endófitos associados à planta parasita *Phoradendron perrottetti* (DC.) EICHLER e sua hospedeira *Tapirira guianensis*** AUBL. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- ARNOLD, A. Elizabeth; LUTZONI, Francois. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541-549, 2007.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**, p. 117137, 1998.
- CARVALHO, C. R. et al. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v. 57, n. 2, p. 95-107, 2012.
- BANERJEE, D. (2011). Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. **Res. J. Microbiol.** 6: 54-62.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, p. 421-437, 2013.
- CONTI, R.; GUIMARAES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Cienc. Cult.** São Paulo, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.
- DOS SANTOS, P. J. C.; SAVI, D. C.; GOMES, R. R.; GOULIN, E. H.; SENKIV, SANTOS, P. J. C. et al. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research** (Print), v.186, p.153-160, 2016.
- FEICHTENBERGER, E. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-28, 1994.
- FERREIRA, S. B. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcolólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 42, n. 1, p. 27-31, 2010.
- FORZZA, RC. PM Leitman, A Costa, AA Carvalho Jr. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. **Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010. Introdução: síntese da diversidade brasileira, p. 19-42.
- GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? **Mycopathologia**, v. 156, p. 41-45, 2002.

HESS, S. C.; MONACHE, F. D. Divergioic Acid, a Triterpene from *Vochysia divergens*. **J. Braz. Chem. Soc.** São Paulo, v. 10, p. 104-106, 1999.

HOKAMA, Y. et al. Endophytic fungi isolated from *Vochysia divergens* in the pantanal, Mato Grosso do Sul: diversity, phylogeny and biocontrol of *Phyllosticta citricarpa*. **Endophytic Fungi: Diversity, Characterization and Biocontrol**, 4th Edn., ed E. Hughes (Hauppauge, NY: Nova Publishers), p. 1-25, 2016.

JÚNIOR, Silva. MC; 100 Árvores do Cerrado: Guia de Campo. Brasília: **Rede de Sementes do Cerrado**, 2005.

KLINK, C.s A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KUPPER, K.C; BELLOTE, J.A.M; GOES, A. Controle Alternativo De *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal Da Queda Prematura Dos Frutos Cítricos. **Rev. Bras. Frutic.** v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009

LAIRD, S. A. in Biodiversity and traditional knowledge – equitable partnerships in practice, edited By Sarah A. Laird, **Earthscan Publications Ltd**, London & Sterling (USA), p. xxii. 2002.

LINHARES, S. & GEWANDSZNAJDER, F. **Biologia Hoje** - Vol 3. São Paulo: ed. Ática, 1998.

LOPES, J.M.S; DÉO, T.F.G; ANDRADE, B.J.M; GIROTO, M; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância Econômica Do Citros No Brasil. **Revista econômica de Agronomia**. N. 20, 2011. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. (Org.). O Bioma Cerrado. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

NORILER, S.A.; SAVI, D.C.; ALUIZIO, R.; PALÁCIO-CORTEZ, A.M.; POSSIEDE, Y.M.; GLIENKE, C. Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, Pantanal and Cerrado. **Front. Microbiol.** | doi: 10.3389/fmicb.2018.01526. 2018.

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.

PARTIDA-MARTINEZ, Laila P. Pamela; HEIL, Martin. The microbe-free plant: fact or artifact?. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 100, 2011.

PETRINI, O.; FISHER, P. J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 87, n. 4, p. 647-651, 1986.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, DA de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande– Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

SACCARO JUNIOR, N. L. Desafios da bioprospecção no Brasil. Texto para Discussão, **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA)**, 2011.

SAVI, D. C. et al. Antitumor, Antioxidant and Antibacterial Activities of Secondary Metabolites Extracted by Endophytic Actinomycetes Isolated from *Vochysia divergens*. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences**, v. 5, n. 1, 2015.

SAVI, Daiani C. et al. *Phaeophleospora vochysiae* Savi & Glienke sp. nov. Isolated from *Vochysia divergens* found in the Pantanal, Brazil, Produces Bioactive Secondary Metabolites. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 3122, 2018.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites, **Mycological Research**, v.106 (9), p. 996-1004, 2002.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, and endophytic fungus of Pacific Yew. **Science** 260, 214-216, 1993.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **The New Phytologist**, v. 142, n. 2, p. 335-346, 2002.

APÊNDICE 1 – RESULTADO DA TAXA DE CRESCIMENTO DO *C. abscissum*

TABELA 4: RESULTADO EM TRIPLICATA DO CRESCIMENTO DO *C. abscissum* EM CENTÍMETROS.

Taxa de crescimento do <i>Colletotrichum abscissum</i>						
Nº isolado	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média	Disco micelial	Total
4	4.55	4.85	4.45	4.62	0.80	3.82
12	4.35	4.2	4.35	4.30	0.80	3.50
14	3.8	4.4	4.2	4.13	0.80	3.33
18	4.6	4.65	4.9	4.72	0.80	3.92
25	4.4	4.5	3.75	4.22	0.80	3.42
31	4.6	4.6	4.65	4.62	0.80	3.82
32	4.45	4.6	4.35	4.47	0.80	3.67
47	4.6	4.6	4.4	4.53	0.80	3.73
55	4.1	4.1	4	4.07	0.80	3.27
63	3.45	3.6	3.4	3.48	0.80	2.68
67	2.05	1.85	2.05	1.98	0.80	1.18
72	3.2	3.5	3.4	3.37	0.80	2.57
79	4.8	4.7	4.9	4.80	0.80	4.00
80	4.3	4.4	4.4	4.37	0.80	3.57
85	3.75	3.75	4.2	3.90	0.80	3.10
87	4.4	4.2	3.9	4.17	0.80	3.37
94	4.4	4.3	3.8	4.17	0.80	3.37
95	4.2	4.5	4.3	4.33	0.80	3.53
111	4.25	4.6	4.6	4.48	0.80	3.68
128	3.55	3.35	3.45	3.45	0.80	2.65
Metanol	4.95	5.05	4.95	4.98	0.80	4.18
Derosal	2.75	2.75	2.7	2.73	0.80	1.93

APÊNDICE 2 – RESULTADO TESTE TUKEY

TABELA 5: RESULTADO DO TESTE TUKEY COMPARANDO A AÇÃO DO EXTRATO COM O CONTROLE NEGATIVO (METANOL).

Isolado	Metanol
4	0,6702 ns
12	0,006483*
14	0,000198*
18	0,9681 ns
25	0,001179*
31	0,6702 ns
32	0,1249 ns
47	0,3074 ns
55	0,04598*
63	1,5E-10*
67	8,24E-13*
72	1,51E-11*
79	0,9997 ns
80	0,0232*
85	0,001142*
87	0,0004071*
94	0,0004071*
95	0,01241*
111	0,1595 ns
128	7,64E-08*
Metanol	
Derosal	21,21 ns

Nota: Os asteriscos (*) indicam diferença significativa com valor de $\alpha < 0,05$ e ns indica que a diferença não foi significativa.

APÊNDICE 3 – RESULTADO ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	31.70383	21	1.509706	44.73203	4.97E-23	1.800885
Dentro dos grupos	1.485	44	0.03375			
Total	33.18883	65				