

ESTUDO DO POTENCIAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NO CONTROLE DO AGENTE CAUSAL DA FUSARIOSE EM TOMATEIRO

Kellem Ângela Oliveira de Sousa¹; José Fábio França de Orlanda²; Gustavo de Andrade Bezerra¹; Thatyane Pereira de Sousa³.

¹ Graduandos do curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Imperatriz, Maranhão, Brasil. guandrade.b@gmail.com

² Professor, Doutor da UEMA. Imperatriz, Maranhão, Brasil.

³ Mestranda em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, Pará, Brasil.

RESUMO: O presente trabalho objetivou avaliar a capacidade antimicrobiana *in vitro*, de diferentes extratos de fungos endofíticos, como alternativa no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Foram obtidos oito isolados endofíticos de plantas do Cerrado Maranhense e de interesse econômico, a saber: aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), jenipapo (*Genipa americana* L.), milho (*Zea Mays* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), vinagreira (*Hibiscus sabidarriffa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.). Os isolados endofíticos das espécies foram identificados em *Aspergillus niger* e *Penicillium italicum*, com características morfológicas distintas entre as colônias e todos os isolados endofíticos verificou-se crescimento mediano. Para a atividade antimicrobiana, foi realizada a extração dos metabólitos dos isolados endofíticos com os solventes: Acetato de Etila, Clorofórmio e Diclorometano, posteriormente realizado o bioensaio através do confronto direto do antagonista (endófito) sobre o *Fusarium Oxysporum* f.sp. *lycopersici*, raça 1, pelo método de difusão em ágar. Os extratos dos isolados endofíticos obtidos do solvente Clorofórmio apresentaram capacidade inibitória, assim interferindo no crescimento do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça. Que foram provenientes do caule milho (II) e de jenipapo, com diâmetros de 13mm e 11mm, respectivamente, os outros extratos dos isolados apresentaram halos de inibição inferior.

PALAVRAS-CHAVE: antibiose, controle biológico, fitopatógeno.

STUDY OF POTENTIAL ENDOPHYTES IN CONTROL OF THE CAUSAL AGENT IN TOMATO FUSARIOSIS

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the ability antimicrobial *in vitro* of different extracts of endophytic fungi as an alternative in biocontrol of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Eight endophytic isolates were obtained from plants of the Cerrado Maranhense and economic interest, namely: mastic (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), jenipapo (*Genipa americana* L.), maize (*Zea Mays* L.), cassava (*Manihot esculenta* Crantz), vinegar (*Hibiscus sabidarriffa* L.) and soursop (*Annona muricata* L.). The isolated endophytic species were identified in *Aspergillus niger* and *Penicillium italicum*, with distinct morphological characteristics between the colonies and all endophytic growth medium was found. Antimicrobial activity was performed to extract the metabolites of endophytic isolates with solvents: Ethyl Acetate, Chloroform and Dichloromethane subsequently performed bioassay through direct confrontation of the antagonist (endophyte) on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 1, by agar diffusion method. The extracts of endophytic isolates obtained from solvent Chloroform showed inhibitory capacity, thus interfering with the growth of

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* race 1 were derived stem corn (II) and jenipapo with diameters of 13 mm and 11 mm, respectively, the other extracts of the isolates showed inhibition halos below.

KEYWORD: antibiosis, biological control, plant pathogen.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas no mundo e considerada uma cultura de grande importância econômica (FERNANDES et al., 2007; CARVALHO et al., 2002).

Por ser uma das culturas mais cultivadas no Brasil, estando distribuída em quase todos os estados, a plantação de tomate está sujeita ao ataque de uma grande diversidade de patógenos microbianos. Os fungos são os maiores responsáveis pelas doenças que ocorrem no tomateiro (LOPES; SANTOS, 1994).

Dentre as doenças, a murcha-de-fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici*, é umas das doenças mais importantes e disseminada na maioria dos países onde o tomateiro é cultivado (KUROZAWA; PAVAN, 1997).

Como alternativa ao uso de agroquímicos, o controle biológico de fitopatógenos tem se apresentado como uma forma promissora e viável, por meio do uso de microrganismos como agentes protetores de plantas cultivadas (KUNOH, 2002).

Tendo em vista o potencial dos fungos endofíticos como possibilidade no controle biológico, este trabalho tem como objetivo

avaliar a capacidade antimicrobiana *in vitro* de diferentes extratos de fungos endofíticos no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

As amostras de espécies vegetais foram coletadas em área do município de Governador Edson Lobão (MA), situado na Região Tocantina, realizadas no período da manhã, entre os meses de março e abril de 2011.

Após as coletas, as amostras foram devidamente armazenadas e encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC) da Universidade Estadual do Maranhão, campus de Imperatriz. As espécies coletadas foram: milho (*Zea Mays* L.), mandioca (*Manihot esculenta*), graviola (*Annona muricata* L.), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), jenipapo (*Genipa americana* L.) e vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*), todas apresentando tecidos e órgãos aparentemente sadios, sem qualquer sintoma de doenças.

A esterilização e isolamento dos microrganismos foram realizados de acordo com a metodologia adotada por Souza et al. (2004).

Os fungos endofíticos isolados, em meio de cultura padrão contendo Batata, Dextrose e Ágar (BDA), foram mantidos em temperatura ambiente e periodicamente avaliados visualmente quanto ao desenvolvimento do micélio vegetativo aéreo. A identificação dos isolados foi feita com base na morfologia de suas estruturas vegetativas e reprodutivas de acordo com chaves de identificação encontradas na literatura específica, descrito por Barnett e Hunter (1987).

Os extratos brutos dos fungos endofíticos que inibiram os patógenos nos ensaios de antagonismo, utilizando o solvente orgânico (acetato de etila, clorofórmio e diclorometano) foram utilizados para extração dos metabólitos secundários.

O antagonismo dos fungos endófitos isolados de plantas foi realizado pelo método da cultura pareada, ou simplesmente pareamento, que consistiu no confronto direto do antagonista (endófito) e do fungo patogênico de interesse agrônômico em placas de Petri contendo meio de cultura sólido (MARIANO, 1993).

O método de difusão em ágar é um dos mais simples e confiáveis métodos para teste da susceptibilidade antimicrobiana. Neste método, pequenos discos de filtro de 6 mm impregnados de extratos de fungos endofíticos são dispostos numa placa de Petri com meio de cultura BDA inoculada com

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici*. As placas foram incubadas por 24 horas a 28 °C.

Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição de crescimento ao redor de cada disco antimicrobiano foram medidos para verificar a susceptibilidade de cada extrato. Os resultados obtidos foram comparados com medidas de diâmetro de zonas, caso houvesse a inibição, em milímetros, de acordo com critérios interpretativos de tabelas publicadas pelo órgão National Committee For Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 2002).

Das seis espécies vegetais em estudo, foram isoladas no total oito fungos endofíticos de tecidos e órgãos aparentemente saudáveis (sete nos caules e um na folha). Destes oito isolados, três fungos endofíticos foram isolados do milho (dois endofíticos do caule e um endofítico da folha), um do caule da mandioca, um do caule da graviola, um do caule da aroeira, um do caule do jenipapo e um do caule da vinagreira.

Alguns fungos demonstram certa especificidade por determinados órgãos vegetais (CLAY; SCHARDL, 2002). De acordo com Felizardo (2005), trabalhando com *Licnophora pinaster* (arnica mineira) verificou a presença de *Glomerella cingulata* apenas em amostras provenientes das folhas.

Dos oito isolados endofíticos, seis colônias apresentaram micélios aéreos com aspecto algodinoso, presença de grânulos e de coloração de cor negra e duas colônias de coloração verde oliva, micélio apresentado textura carmuçada sem presença de grânulos, observados em caule do jenipapo e caule do milho.

Neste trabalho foram identificadas duas espécies de isolados endofíticos: *Aspergillus niger* e *Penicillium italicum*, pertencentes ao filo Ascomycota.

O *Aspergillus niger* predominou nas seguintes espécies vegetais: milho (caule I e folha), mandioca (caule); vinagreira (caule),

graviola (caule) e aroeira (caule). O fungo *Penicillium italicum* predominou nas espécies jenipapo (caule) e milho (caule II).

A extração dos metabólitos secundários dos isolados endofíticos foram obtidos a partir dos solventes acetato de etila, clorofórmio e diclorometano.

De acordo com a Tabela 1 os resultados mostraram que somente no extrato empregando o solvente clorofórmio houve a presença de picos de absorção máxima entre os comprimentos de onda de 230 a 360 nm, indicando a presença de compostos com grupamentos químicos fenólicos.

Tabela 1. Análise espectrofotométrica dos extratos de fungos endofíticos em diferentes solventes.

Isolados	Comprimentos de Onda (nm)		
	Acetato de Etila	Clorofórmio	Diclorometano
Aroeira (caule)	< LD	240,0	< LD
Graviola (caule)	< LD	258,0	< LD
Jenipapo (caule)	< LD	240,0	< LD
Mandioca (caule)	< LD	359,0	< LD
Milho (folha)	< LD	358,5	< LD
Milho (caule I)	< LD	343,3	< LD
Milho (caule II)	< LD	238,2	< LD
Vinagreira (caule)	< LD	284,0	< LD

Onde: LD = Limite de Detecção.

Foram obtidos as espécies *Aspergillus niger* e *Penicillium italicum*. No crescimento vegetativo, todos os isolados apresentaram crescimento mediano, atingindo 10 cm de diâmetro no intervalo de 4 a 8 dias. Os estudos de controle antimicrobiano de *Fusarium oxysporum*

revelaram que os resultados obtidos com o solvente clorofórmio apresentou capacidade inibitória *in vitro*, apresentando halos de inibição maiores, proveniente do caule do milho II e do jenipapo, com diâmetro de 13 mm e 11 mm, respectivamente.

Extratos de fungos endofíticos isolados do caule do milho e do jenipapo podem ser uma alternativa promissora para o controle biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

REFERÊNCIAS

- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999, 218 p.
- CARVALHO, G. A.; REIS, R. P.; MORAES, J. C.; FUINI, L. C.; ROCHA, L. C. D.; GOUSSAIN, M. M. Efeitos de alguns inseticidas utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. Agrotec**, Lavras, v. 26, n. 6, Novembro, p. 1160-1166. 2002.
- CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophytes symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v. 160, p.99 - 127. 2002.
- FELIZARDO, V. de O. **Isolamento e identificação de fungos endófitos presentes em arnica mineira (*Lychnophora pinaster* Mart.)**. 2005. 33 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura) - Centro Universitário de Lavras, Lavras, 2005.
- FERNANDES, A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; SILVA, D. J. H. da; BARBOSA, J. G.; PEDROSA, A. W. Cultivo sucessivo de plantas de tomate oriundas de sementes e propagação vegetativa em sistema hidropônico. **Pesquisa Agropecuária**, Brasília, v.42, n.7, p. 1013- 1019, jul. 2007.
- KUNOH, H. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **Journal of General Plant Pathology**, v.68, p.249-252. 2002.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. P. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. v. 2. São Paulo: Ed. Ceres, 2005. p. 690-719.
- LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/SPI, 1994. 67p.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. I, p. 369- 409, 1993.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for fungi that grow aerobically**, approved standard. 15 ed., v. 20, n. 2, 33 p., 2002.

SOUZA, A. Q. L. de; SOUZA, A. D. L. de;
ASTOLFI FILHO, S. BELÉM PINHEIRO,
M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J.
O. Atividade antimicrobiana de fungos
endofíticos isolados de plantas tóxicas da
amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.)
Rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta**
Amazonica, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.