

AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOCONTROLADOR DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* COM METABÓLITOS DE FUNGOS MARINHOS

Gilvania Luana da Rocha Silva¹; Idjane Santana de Oliveira²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas - CAV – UFPE; E-mail: gilvanialuana2@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Microbiologia e Imunologia – CAV – UFPE. E-mail: idjaneoliveira@gamil.com

Sumário: Os fungos encontrados no ambiente marinho produzem metabólitos secundários que podem ser utilizados na indústria farmacológica, cosmética, de suplementos nutricionais, entre outros. Esses organismos têm sido utilizados na área de estudo biotecnológico em virtude da produção de enzimas e metabólitos secundários diferenciados. Em contra partida, os Fitonematóides são organismos que vivem no solo, parasitando raízes tuberosas, conseqüentemente ocasionam grande perda na produção agrícola. Entre os fitonematóides de maior expressão econômica em relação à diversas culturas no Nordeste, como cana-de-açúcar, inhame, tomateiro, hortaliças em geral, encontra-se o nematoide das galhas *Meloidogyne sp.* Nesse contexto, esse seguinte trabalho teve como objetivo Avaliar a Ação Biocontroladora em Fitonematóides através do Metabólitos secundário de fungos marinhos. As amostras das Algas Vermelhas foram coletadas no litoral Pernambucano. Todos processos de Isolamento, Extração de Metabólitos, Preservação, Extração de Nematóides e Testes Biológicos foram desenvolvidos no laboratório de Microbiologia e Imunologia do CAV/UFPE. Os metabólitos podem ser testados para atividade antimicrobiana, como biocontrole de fitonematóides, atividade citotóxica para celulares cancerígenas/tumoral, entre outras aplicabilidades.

Palavras-chave: biocontrole; fitonematóides; fungos marinhos,

INTRODUÇÃO

Dentro do universo dos microrganismos marinhos, os fungos têm sido encontrados associados a algas, plantas, invertebrados, moluscos, e ainda presentes em sedimentos de costas e regiões de mangue (FEHER, 2003). No entanto, há poucos estudos sobre os fungos marinhos cultiváveis no Brasil (MANILAL et al., 2010). O ecossistema marinho tem sido bastante estudado na obtenção de microrganismos produtores de metabólitos, por representarem mais de 95% da biosfera, comportando uma ampla variedade de organismos que produzem substâncias bioativas potentes, únicas e diversificadas, as quais são resultantes de suas adaptações às complexas condições impostas pelo meio (SCHWARTSMANN et al., 2001). Os Fitonematóides em grande índice populacional, causa prejuízos econômicos na agricultura, pois esses organismos parasitam raízes que são comercializadas e utilizadas para o consumo humano. O fungo *Paecilomyces lilacinus*, por exemplo, é um fungo do solo que tem se mostrado efetivo no biocontrole de espécies de *Meloidogyne* (KERRY, 1990). Ne contexto, esse seguinte trabalho teve como objetivo Avaliar o efeito biocontrolador de *Meloidogyne incognita* com metabólitos de fungos marinhos. Conseqüentemente, o controle desses patógenos é vital para a exploração agrícola comercial, o que pode ser feito com o uso de nematicidas sintéticos, resultantes da indústria petroquímica (CAMPOS et al., 1990; CAMPOS, 1997).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para buscar verificar se os fungos marinhos seriam eficazes no controle dos Fitonematóides realizamos os procedimentos que serão descritos a seguir. Iniciou-se o isolamento de fungos marinhos realizado a partir de amostras de sargaços (Alga Vermelha) e usando água do mar para preparação dos diferentes tipos de meios de cultura. Foram coletadas Algas Vermelhas (Rodophyta) do litoral de PERNAMBUCO. Após a coleta, preparou-se os meios de cultura MEA, Tubaki, usando água do mar natural e contendo antibiótico cloranfenicol para evitar contaminação com bactérias. As algas coletadas foram lavadas com água destilada estéril, para retirar todo o excesso de areia e também diminuir o quantitativo de microrganismos encontrados na microbiota externa da alga, para minimizar a contaminação. Os fragmentos de sargaço foram semeados em Placa de Petri contendo os meios de cultura e incubados por 20 dias para crescimento fúngico, em temperatura ambiente em torno de 25 a 28°C. Foram realizados alguns isolamentos para a identificação a nível de gênero dos fungos das amostras da Alga vermelha, todos os fungos pertencem ao gênero *Aspergillus*.

Em seguida foram realizadas a Produção e Extração de metabólitos fúngicos. Após crescimento fúngico em meio líquido (YES e CALDO GLICOSADO), foi separado o micélio do líquido metabólico por filtração em papel de filtro. O micélio foi lavado, várias vezes com água destilada estéril, prensado e seco para retirar da água. Ao fragmento de micélio seco foi adicionado tipos diferentes de solvente num volume variável até cobrir o micélio e em seguida triturado no solvente. O material no Becker ficou incubando por no mínimo 2h e máximo 24h no congelador para não evaporar o solvente e em seguida o extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo para separar restos de micélio triturado e o extrato metanólico ou etanólico ou de clorofórmio foi rotaevaporado e seria ressuspendido em DMSO e em seguida as amostras foram guardados a 4°C.

Para as extrações dos nematoides, foi utilizado o Inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.) com sintomas da casca-preta, com a trituração e em seguida a centrifugação utilizando sacarose (COOLEN & D'HERDE, 1972). As plantas do Tomateiro da variedade Santa Cruz, com trinta dias de idade, foram cultivadas em solo esterilizado, em copo descartáveis. Após a extração e produção dos metabólitos, foram realizados os testes de biocontrole. Antes do teste do metabólito do micélio nas mudas, foi necessário fazer um teste invitro com 20 nematoides, onde o mesmos morreram após a inoculação de 1 µL de DMSO, portanto não foi realizado o teste do metabólito extraído do micélio nas plantas. Posteriormente, foi utilizado 30 ml do líquido metabólito de cada fungo + 1 ml da suspensão dos nematóides (500 nematoides) e incubado por 4h. Em seguida inoculadas em 4 plantas. Após uma semana, os sistemas radiculares das plantas serão cuidadosamente retirados do substrato e lavados, e submetidos ao processo de coloração por fucsina ácida nas raízes, para detectar a infectabilidade.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Todas as mudas de tomateiro foram cultivadas com solo estéril por 30 dias. Após esse período, 500 nematoides foram inoculados em cada muda do tomateiro e divididas em tratamentos, a saber: T(0), T(1), T(2) e T(3), nesse sentido, Amostra controle, Amostra com Meio de Cultura Yes e Caldo Glicosado, Amostra com Líquido Metabólito e Teste In Vitro, respectivamente, conforme Tabela 1. Nos resultados in vitro, o DMSO foi tóxico aos Nematoides, pois os 20 nematoides que foram inoculados em placa de petri, morreram após 10 minutos de inserção de 1 µL de DMSO na suspensão.

Tabela 1: Tratamentos das plantas de Tomateiro

T(0)	Planta + Nematoides + Água
T(0)	Planta + Nematoides + Água
T(1) 1	Planta + Nematoides + Meio Líquido (Caldo Glicosado)
T(1) 2	Planta + Nematoides + Meio Líquido (YES)
T(2) 1	Planta + Nematoides + Líquido Metabólito do Fungo G2 (YES)
T(2) 2	Planta + Nematoides + Líquido Metabólito do Fungo G2 (CALDO GLICOSADO)
T(2) 1	Planta + Nematoides + Líquido Metabólito do Fungo G7 (YES)
T(2) 2	Planta + Nematoides + Líquido Metabólito do Fungo G7 (CALDO GLICOSADO)
T(3)	1 µL de DMSO + 20 Nematoides

Após 10 dias de inoculação dos 500 Nematoides em cada planta de Tomateiro, foram realizadas o processo de coloração das raízes com fucsina ácida. As raízes foram retiradas com cuidado e lavadas com água corrente em baixa velocidade. Em seguida, foram retiradas as raízes das plantas e colocado 10 ml do corante Fucsina ácida por 30 min em cada amostra. Posteriormente, todas as amostras de raízes foram analisadas em microscópico óptico e lupas. Com a análise das amostras das raízes, constatou-se que os nematoides não conseguiram infectar nenhuma amostra de raiz incluindo os tratamentos/ amostras controle de infecção T(0), pois não havia indícios de infectabilidade dos nematoides, uma vez que, todo o procedimento foi realizado como devidamente aconselha a Literatura. Descartando assim, a possibilidade de um teste positivo de biocontrole, visto que, os nematoides não infectaram a amostra de controle do tomateiro. Portanto desconsidera-se as demais amostras, pois obtiveram o mesmo resultado da amostra controle. A metodologia e protocolo estão sendo repensados, considerando que não existe padronização de procedimento por se tratar de método de controle natural, que não agride o ambiente. no controle fitonematóides. Desse modo, surgiram algumas hipóteses da imprecisão dessa pesquisa, tais como: a) as mudas do tomateiro não terem realizado processos fisiológicos liberando hormônios, uma vez que, os fitonematóides não foram atraídos para parasitar a raiz do tomateiro; b) a quantidade de fitonematóides por amostras foi insuficiente; assim, esse trabalho permite que outras pesquisa possam ser realizadas a partir dos limites apresentados na realização dessa investigação, entre outras possibilidade a serem investigadas.

CONCLUSÕES

O presente trabalho se empenhou em realizar teste biológicos contra os Fitonematóides do gênero *Meloidogyne*. No entanto, os testes que foram realizados não foram satisfatórios para esse biocontrole com metabólitos de fungos marinhos, até o momento.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa e apoio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS

- Sasser, J. N., and D. W. Freckman, 1987. A world prospective on nematology: the role of the society, pp. 7–14 in *Vistas on Nematology*, edited by J. A. Veech and D. W. Dickson. Society of Nematologists, Hyattsville, MD.
- Schwartzmann, G., da Rocha, A.B., Berlinck, J.G.S., Jimeno, J., 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol.* 2, 221 – 225.
- Nka Devi, R Rajendran, SK Sundaram, 2011. [Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria.](#)
- Campos, V.P. Implicação da sobrevivência dos nematóides em solos e raízes de plantas no controle dos fitopatógenos. *Informe Agropecuário* 16:15-16. 1992.
- Campos, V.P., Sivapalan, P. & Gnanapragasam, N.C, 1990. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (Eds.). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Wallingford. CABI Publishing, CAB International. pp.387-430.
- Blunt, J.W 2009. Copp, B.R.; et al. *Natural Product Reports*, Vol.26, no.170.
- FEHER, M.; Schmidt, G.J, 2003. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, Vol.43, no.218.
- Coolen, W.A.; D'herde, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: Nematology and Entomology Research Station, p.77. 1972
- Trojan D. G., Vaz L. S. B. *Metodologias para estudo e diagnóstico de nematóides parasitas de plantas no brasil.*
- Goulart A. M. C., *Análise nematológica: Importância e Princípios gerais.* Planaltina/DF: Embrapa Cerrados, 2010.
- Moura R. M. I. S. Oliveira & Torres G. S. C. *Fitonematóites associados ao inhamé da costa em seis municípios produtores da Zona da Mata do estado de Pernambuco Brasil, 2005.*
- Silva C. H. D. *Fungos associados a invertebrados marinhos: Isolamento, Seleção e Avaliação da Produção de enzimas Celulolíticas, 2010.*
- Ferraz, S.; Santos, M.A. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. In: LUZ, W.C. (Ed). *Revisão Anual de Patologia de Plantas.* Passo Fundo: EMBRAPA, 1995. p.283-314.
- Kerry, B.R. An assessment of progress toward microbial controle of plant parasitic nematode. *Journal of Nematology*, v. 22, n.45, p.621-631, 1990. (Supplement).
- Dunn, M.T. et al. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. *Scanning Electron Microscopy*, p.1351-1357, 1982.