

# BIOHERBICIDE PRODUCTION BY *DIAPORTHE SP*, ISOLATED FROM BRAZILIAN BIOLOGICAL SOURCES

Camila Marcuz, Marcio A. Mazutti, Raquel C. Kuhn

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Departamento de Engenharia Química, Campus Santa Maria, RS

camila\_marcuz@hotmail.com, marciomazutti@gmail.com, raquelckuhn@yahoo.com.br

**Abstract.** *The production of a bioherbicide for the biological control of weeds requires the development of a series of steps, ranging from the selection of a suitable microbial strain for the production of product having herbicidal action until final formulation. Thus, this study aimed to select microorganisms from biological resources of the Pampa biome with potential for producing phytotoxins. Systematic samplings were performed with infectious symptoms in different places of the Pampa biome. Therefore, the first stage of the research was to select isolates with pathogenic potential inhibition and, after, test them in seedlings of plants. From the first step, there were obtained thirty-nine pure fungal cultures, from thirteen different species of weeds. After, tests in cucumbers, spraying the supernatant on the leaves, showed that of the total isolated, twenty-eight had some kind of phytotoxic effect. However, only the fungus that showed the best inhibitory was identified through the use of molecular biology technique and it was classified as *Diaporthe sp*, highlighting the potential for biocontrol of this genre.*

**Palavras-chave:** *Bioherbicida, Diaporthe, Fungo*

## 1. INTRODUÇÃO

O controle químico é, atualmente, o método mais empregado no que diz respeito ao combate às plantas daninhas. Segundo

Leite *et al.* [1], sua ampla empregabilidade está associada à eficiência e praticidade do método. Contudo, para Silva [2], a utilização intensiva e/ou incorreta de herbicidas pode ocasionar implicações negativas ao ambiente, à saúde humana e animal, além de representar uma parcela significativa dos custos de produção, da pressão de seleção de espécies de plantas daninhas tolerantes e do surgimento de biótipos resistentes dentro das populações.

Ainda, conforme verificado por Duke *et al.* [3], bioherbicidas apresentam algumas vantagens em relação a herbicidas sintéticos. Dentre as quais, destacam-se por serem produtos biodegradáveis, possuem alvo específico, serem ativos em pequenas quantidades, além de servirem como modelo para o desenvolvimento de novos herbicidas sintéticos, menos agressivos ao meio ambiente.

Frente a isso, com o recente avanço da biotecnologia no Brasil, aliado a diversidade biológica local, é cada vez mais crescente o interesse em micro-organismos que produzam metabólitos secundários com atividade herbicida. Sendo assim, o presente trabalho tem como principal objetivo o isolamento de fungos fitopatogênicos e posterior avaliação quanto ao seu potencial em produzir fitotoxinas, sendo o micro-organismo mais promissor molecularmente identificado.

## 2. METODOLOGIA

Na figura 1, pode-se observar, resumidamente, o protocolo geral das etapas

que envolvem o processo para a produção de um componente extracelular, através de uma fermentação submersa, com potencial atividade herbicida.



Figura 1 - Diagrama do processo de coleta e avaliação dos micro-organismos

## 2.1. Coleta das amostras e isolamento dos fungos fitopatogênicos

Foram realizadas coletas de plantas daninhas infectadas, as quais apresentavam sintomas típicos de enfermidades, em diferentes áreas do bioma Pampa.

Cada tecido infectado foi transferido a uma placa de Petri contendo meio de cultura, composto por Batata, Dextrose e Ágar (BDA). O cultivo ocorreu em estufa, a 28 °C, durante sete dias. Após esse período, foram realizadas repicagens sucessivas, até a obtenção de culturas puras e, para cada cultura, atribuiu-se uma sigla de identificação.

As culturas puras foram novamente cultivadas, para serem utilizadas no processo de fermentação.

## 2.2. Processo fermentativo e obtenção do sobrenadante

O crescimento dos fungos fitopatogênicos isolados foi realizado por

fermentação submersa. Esta etapa do processo foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 125 mL de meio de cultura industrial.

Para a inoculação, verteu-se 25 mL de água destilada esterilizada dentro de cada placa de Petri, vertendo, em seguida, a mistura de água e fungo para dentro de cada um dos Erlenmeyers, com o meio já autoclavado. O processo fermentativo foi realizado em triplicata sob temperatura de 28°C e agitação de 120 rpm, durante sete dias.

Após esse período, cada fermentado foi submetido à centrifugação, responsável em separar as células (biomassa) do caldo fermentativo (sobrenadante). A biomassa foi submetida à avaliação de massa seca e o sobrenadante foi utilizado para verificação do potencial bioherbicida em bioensaios.

## 2.3. Screening

O *screening* teve como finalidade selecionar os isolados fúngicos que liberaram substâncias inibidoras do crescimento de plantas no sobrenadante.

Sendo assim, o sobrenadante foi filtrado e utilizado para avaliar a atividade bioherbicida em bioensaios. Cada bioensaio foi composto por vinte plantas de pepinos, cultivadas em estufa e, cada um dos fungos fermentados foi testado, como diferentes bioherbicidas. Para isso, borrifou-se, homogeneamente, 35 mL do caldo obtido sobre as folhas das plantas, na fase inicial de crescimento. Adicionalmente, borrifou-se o meio de cultura puro em um dos bioensaios (ensaio teste), para fins de comparação.

Depois de 21 dias da aplicação do sobrenadante, as plantas foram avaliadas visualmente, analisando-se o surgimento de manchas e perda de vida das mudas. Além da análise visual, foi estimado, em relação ao ensaio teste: a diminuição percentual no crescimento, através do comprimento das plantas e da raiz, o peso da massa verde e o peso da massa seca.

## 2.4. Análise molecular

O fungo que se apresentou mais promissor para a produção de bioherbicida, foi molecularmente identificado. Para isso, realizou-se a extração de seu DNA, a partir de alíquotas de crescimento em meio líquido.

Após a extração do DNA, a região do nrDNA para fungos foi amplificada com posterior realização de eletroforese, para verificar a amplificação. Só então as amostras de DNA foram coradas e observadas em luz ultravioleta.

Os produtos da PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) foram purificados, seguindo as instruções do fabricante, e o sequenciamento das amostras foi realizado. Os fragmentos sequenciados foram analisados para a obtenção das sequências consenso e a partir disso, as de maior similaridade foram analisadas.

Para selecionar a espécie com máxima semelhança, utilizou-se a matriz de correlação, a qual a define entre duas a duas espécies.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da coleta de treze diferentes espécies de plantas daninhas infectadas, foram isoladas trinta e nove culturas fúngicas puras. As espécies de plantas coletadas com o respectivo número de fungos encontrados, bem como as siglas atribuídas a essas culturas, são apresentadas na Tabela 1.

Dos trinta e nove fungos isolados, vinte e oito apresentaram algum tipo de efeito fitotóxico ao ser tratado com o sobrenadante. Dentre os tratamentos, 54% apresentou efeito inibitório no comprimento da haste e 51% no comprimento do sistema radicular. Quanto à massa verde, pode-se observar que apenas seis tratamentos apresentaram efeito inibitório na raiz e dezenove na haste da planta. Com isso, nota-se que, no geral, os efeitos foram mais frequentes na haste.

Na análise visual foi observado, nas folhas das plantas, alguns efeitos fitotóxicos, sendo estes apresentados na figura 2 e comentados a seguir.

Tabela 1 - Plantas daninhas infectadas e número de isolados fúngicos por planta

Sigla	Planta daninha	Isolado
DF	<i>Commelina erecta</i> (Commelinaceae)	3
	<i>Solanum paniculatum</i> (Solanaceae)	4
	<i>Sagittaria montevidensis</i> (Alismataceae)	1
	<i>Solanum erianthum</i> (Solanaceae)	2
RS	<i>Ipomoea triloba</i> (Convolvulaceae)	3
	<i>Sorghum halepense</i> (Poaceae)	4
VP	<i>Conoclinium macrocephalum</i> (Asteraceae)	2
	<i>Passiflora edulis</i> (Passifloraceae)	3
	<i>Solanum stipulaceum</i> (Solanaceae)	4
	<i>Solanum americanum</i> (Solanaceae)	5
	<i>Baccharis dracuntifolia</i> (Asteraceae)	3
	<i>Eryngium horridum</i> (Apiaceae)	3
	<i>Senecio brasiliensis</i> (Asteraceae)	2



Figura 2 - Efeitos visuais dos fungos: (a)VP76, (b) DF24, (c) VP51 e (d) ensaio teste

Na figura 2, pode-se observar que, no geral, os efeitos causados pelos diferentes sobrenadantes, foram de amarelecimento, surgimento de manchas e crestamento das folhas.

As manchas foliares, como as causadas pelo fungo DF24 (figura 2(b)), foram observadas já nas primeiras 72 horas após a aplicação do sobrenadante. Essas se apresentam como lesões discretas, distribuídas de forma irregular e limitada somente às folhas pulverizadas.

Já o amarelecimento ao redor das manchas tornou-se generalizado no limbo foliar, formando necrose a partir das pontas e bordas da folha. Porém, as folhas que surgiram após a aplicação do sobrenadante, neste bioensaio, estavam isentas da doença.

Observou-se também, nas figuras 2(a) e 2(c), o sintoma de crestamento, caracterizado por pequenas manchas marrom nas folhas que, muitas vezes, se unem resultando em necrose local, com posterior morte da planta hospedeira.

Apesar dos bons resultados, para definir o tratamento com melhor potencial de controle biológico, refinou-se apenas os tratamentos que apresentaram efeito de inibição em todos os aspectos avaliados. Sendo assim, obteve-se que o efeito mais pronunciado foi verificado para o fungo identificado como VP51, porém, outros fungos (DF12, DF21, VP45 e VP56) também apresentaram atividade considerável.

Tendo que o fungo codificado como VP51 foi o que se apresentou mais promissor para a produção de bioherbicida, este foi identificado. Para isso, o DNA do fungo foi extraído e, a partir de seu sequenciamento, identificou-o, pertencente ao gênero *Diaphorthe*. Porém, embora houvesse grande similaridade com a *Diaphorthe schini*, não foi possível obter certeza quanto à espécie.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isolados e testados trinta e nove fungos, coletados de treze diferentes espécies de plantas daninhas, do bioma Pampa. Desses, vinte e oito apresentaram efeitos fitotóxicos e, ainda, aproximadamente 53% do total, apresentaram efeito na inibição do crescimento.

Dentre os fungos que apresentaram efeitos em todas as categorias analisadas, foi selecionado o mais promissor, codificado como VP51, para identificação, através de análise morfológica. Obteve-se então, que o fungo com maior potencial para a produção de bioherbicida, dentre os testados, pertence ao gênero *Diaphorthe*. Com isso, foi comprovado que uma classe desse gênero apresenta resultados de inibição do crescimento e efeito fitotóxico de crestamento e amarelecimento das folhas em plantas testes.

Esses resultados demonstram a possibilidade da utilização de recursos do meio para o controle de plantas daninhas. Além disso, os resultados obtidos, a priori, ressaltam o potencial de biocontrole do fungo *Diaphorthe* sp, sendo necessário otimizar os processos e os meios fermentativos, a fim de obter um produto comercializável, reduzir os custos envolvidos e aumentar a produção de metabólitos.

## REFERÊNCIAS

- [1] C. R. F. Leite, J. C. V. Almeida, C. E. C. Prete, "Aspectos fisiológicos, bioquímicos e agronômicos dos herbicidas inibidores da enzima ALS (AHAS)", Londrina: Célio Roberto Ferreira Leite, 1998, p. 81
- [2] F. A. M. Silva, "Seleção de microrganismos com potencial de produção de compostos alelopáticos para o controle de plantas" Dissertação - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004. P. 60
- [3] O. S. Duke, H. K. Abbas, T. Amagasa, T. Tanaka, "Phytotoxins of microbial origin with potential for use as herbicides", 1996 p.82-113.