**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE BRIÓFITA NO CONTROLE DA FERRUGEM DO JAMBU**

Kethillem Milena Santana Dantas Barros1; Thyago Gonçalves Miranda2; Raynon JoelMonteiro Alves3; Dalila Leal Perreira4; Alcindo da Silva Martins Junior5; Ana Cláudia Caldeira Tavares-Martins6

1 Graduanda em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas. Universidade do Estado do Pará. milenadantaswk@gmail.com.

2 Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia. Universidade do Estado do Pará. thyagomiran@hotmail.com.

³ Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia. Universidade Federal do Pará. raynon\_alves@yahoo.com.br.

4 Bióloga. Universidade do Estado do Pará. dalilaleal57@gmail.com.

5 Doutor em Botânica. Universidade do Estado do Pará. alcindo@uepa.br.

6 Doutora em Botânica. Universidade do Estado do Pará. ana.martins@uepa.br.

**RESUMO**

A capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade biológica é uma característica já relatada para as briófitas, contudo a comunidade científica ainda carece elucidar sobre as ações antifúngicas de briófitas, sobretudo com os biótrofos obrigatórios. Nesse sentido, o objetivo deste estudo é avaliar a ação antifúngica de diferentes concentrações de extrato hexânico de *N. undulata*, sobre o fitopatógeno causador da ferrugem (*P. xanthii)* em culturas de Jambu (*A. oleraceae*). Foram produzidas quatro diluições do extrato hexânico de *N. undulata*, utilizou-se um grupo controle (sem aplicação de tratamentos) e quatro tratamentos (T1=0,5; T2=1,0; T3=1,5; T4=2,0 mg/ml) diferentes com cinco repetições cada. Mediu-se o diâmetro dos halos de infecção e esses valores foram comparados através de uma ANOVA, na intenção de verificar se a aplicação dos tratamentos gera uma diferença no diâmetro dos sintomas. Em caso de diferença um teste Tukey foi utilizado como *post-hoc*. Houve diferença significativa entre os diâmetros das unidades amostrais, o teste de Tukey indicou que essa diferença foi do Grupo Controle e os Tratamento 2 e 3 (1,0 mg/ml e 1,5 mg/ml, respectivamente). A análise sobre o crescimento do diâmetro no decorrer dos dias de observação, demonstrou um efeito antifúngico para os Tratamento 2 e 3. A ação antifúngica dos extratos de briófitas pode ser classificada como fungistática, haja vista que a inclinação da tendência de crescimento no decorrer dos dias de observação foi menor nesses tratamentos.

**Palavras-chave:** Ação antifúngica. Briófitas. Fitopatógeno.

**Área de Interesse do Simpósio**: Biotecnologia.

**1. INTRODUÇÃO**

A comunidade científica já reconhece as briófitas como um grupo vegetal com potencial para estudos de atividades biológicas, mesmo assim ainda carece de maior descrição química e farmacológica (COMMISSO *et al.*, 2021).

Miranda *et al.* (2022) em um estudo cienciométrico sobre atividade antifúngica de briófitas, entre os anos de 2000 e 2019, encontraram 53 publicações, sendo dessas apenas uma na América Latina e nenhum estudo, até então, do Brasil.

O potencial antifúngico das briófitas indica que estes vegetais podem ser fontes de moléculas com bioatividades no controle de fitopatógenos em culturas agrícolas, sendo de alternativa mais sustentável diante do uso de agrotóxicos (SAXENA; HARINDER, 2004).

A Amazônia é conhecida por sua agricultura de grandes monoculturas, mas também se destaca, principalmente, por espécies de ciclo curto, sobretudo espécies como o Jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen), com valor regional agregado, tanto econômico quanto cultural, sendo bastante cultivada e consumida e tem sua maior demanda nos períodos festivos, tais como o Círio de Nazaré e as festas de fim de ano (BORGES *et al.*, 2013; HOMMA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2018).

O Jambu é acometido por uma doença causada por um patógeno denominado de ferrugem (*Puccinia xanthii* Schwein), cujos sintomas se manifestam através de lesões na região abaxial das folhas e expande-se até formar pústulas, causando perdas na produtividade e consequentemente perdas econômicas (POLTRONIERI; POLTRONIERI; MÜLLER, 1998).

Entender a capacidade bioativa das briófitas é fundamental e, para isso, é preciso conhecer o perfil químico das briófitas, como no caso do estudo de Miranda *et al.* (2021) que descreveu no perfil volátil de *Neckeropsis undulata* (Hedw.)Reichardt, a presença do composto 1-Octen-3-ol com ação antifúngica, a qual é relatada como sendo, responsável pela inibição micelial *Penicillium expansum* (OKULL; BEELMAN; GOURAMA, 2003) ou o 2-etilhexanol contra *Botrytis cinerea* (WANG *et al.*, 2022).

O objetivo desse estudo foi investigar a ação antifúngica de *Neckeropsis undulata* (Hedw.) Reichardt, sobre o fitopatógeno causador da ferrugem (*Puccinia xanthii* Schwein) em culturas de Jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen).

**2. METODOLOGIA**

**2.1. Obtenção do material vegetal, extração e diluição**

As amostras de *N. undulata* foram coletadas em ecossistema de várzea sobre o tronco de árvores vivas da espécie *Theobroma cacao* L., utilizando-se as técnicas sugeridas por Yano (1984).

As amostras foram secas em pleno sol, por três dias, como briófitas de diferentes famílias, gêneros e espécies podem ocorrer juntas (BEHAR *et al.*, 1992) foi realizada uma triagem e identificação com base em Florschütz (1964) e Costa; Peralta (2015). Para o preparo foi selecionado como solvente o hexano, um total de oito gramas (8g) de *N. undulata* foi utilizada e para a extração dos compostos bioativos foi realizada empregando o método assistido por micro-ondas durante 45 minutos (CHEN; SPIRO, 1994).

Para obtenção das concentrações, utilizou-se o dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente para as diluições na proporção de 20mg/10ml e se preparou os tratamentos utilizadas no experimento nas T1= 0.5 mg/ml, T2= 1.0 mg/ml, T3= 1.5 mg/ml e T4= 2.0 mg/ml (MARKHAM; CHALK; STEWART-JUNIOR, 2006).

**2.2 Processo de inoculação**

As mudas de Jambu foram adquiridas com um produtor da agricultura familiar do município de Santa Bárbara, ainda sem nenhum sintoma e sete dias de cultivo, cabe ressaltar que nenhuma muda passou por tratamentos fitossanitários, para assim obter-se o máximo de padronização. Os fungos utilizados para a infecção artificial dos hospedeiros foram oriundos de materiais infectados em mercados de Belém, para a realização da inoculação foi utilizada um aparato nomeado de “germinatélio” que funcionam com microcâmara úmida para germinação do metabasídio ou teliósporo (APARECIDO; PASSADOR, 2014).

**2.3 Desenho experimental**

Os experimentos foram montados em áreas cobertas e fechadas, na intenção de padronizar e controlar variáveis como exposição ao sol, pluviosidade e ação dos ventos, as plantas de jambu cultivadas em vasos individuais, sendo as amostras divididas em cinco tratamentos: GC (testemunha), T1= 0.5 mg/ml, T2= 1.0 mg/ml, T3= 1.5 mg/ml e T4= 2.0, com cinco repetições cada, totalizando 25 unidades amostrais.

Um total de 25 plantas foram infectadas, borrifou-se nas regiões abaxiais e adaxiais das folhas uma porção de 1 ml dos respectivos tratamentos ao surgimento do sintoma, as quais foram observadas durante 18 dias para verificação de possíveis alterações no diâmetro da infecção.

**2.4 Análise dos dados**

O diâmetro dos sintomas foi mensurado (em milímetros) utilizando-se um paquímetro digital de três em três dias durante 18 dias a partir do aparecimento do primeiro sintoma. A estimativa de diâmetro das infecções de espécies do gênero *Puccinia*, são observações que indicam a suscetibilidade de espécies além de indicar severidade do fungo sobre o hospedeiro (LOPES; BERGER, 2001).

O grau de severidade foi avaliado de acordo com Junghans *et al.* (2003), que consideram o diâmetro de cada pústula para escalonar os graus e assim definiu-se a seguinte escala de notas, S0 = imunidade, sem sintomas, S1 = pústulas puntiformes, < 0,8 mm de diâmetro; S2 = pústulas medianas, de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e S3 = pústulas grandes, > 1,6 mm de diâmetro.

Para analisar a existência de diferenças entre os tratamentos os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), para verificar em quais comparações ocorriam essa diferença entre os tratamentos utilizou-se o teste *post-hoc* de Tukey, todos os testes serão com um nível de significância de α = 0.05, todas as análises e gráficos foram realizadas no software R (DEVELOPMENT, 2017).

**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**3.1 Desenvolvimento e severidade da infecção**

Nas unidades amostrais o primeiro sintoma surgiu entre os dias 14º e 17º de observação do experimento com uma mancha clorótica, conforme apontado por Miranda *et al.* (in prep.), esse é o estágio 1 descrito como clorose inicial na superfície abaxial, mas ainda sem rompimento da epiderme foliar (lesão).

Tanto o grupo controle quantos os tratamentos apresentaram diâmetros com valores acima de 1,6 mm, que para a escala de Junghans *et al.* (2003), considera-se uma alta severidade do patógeno, esses dados demonstram os perigos desse fungo para a cultura do jambu. Espécies muito suscetíveis tornam-se vegetais com potencial para perdas econômicas e por isso devem ser agentes de estudos de controle biológicos, pois apenas assim pode-se efetivamente reduzir a necessidade de aplicação de antifúngicos prejudiciais ao meio ambiente (HARTMAN; MILES; FREDERICK, 2005).

 Patógenos biotróficos, que é o caso da *P. xanthii*, se desenvolvem a partir dos crescimentos diamétricos de tecidos cloróticos, sendo que com o aumento dessa região clorótica pode ter um efeito diferente na fotossíntese foliar (ROBERT *et al.*, 2005), sobretudo no estágio 6 onde, anatomicamente, ocorre o rompimento da epiderme foliar (MIRANDA *et al.*, in prep.).

Shahoveisi et al. (2023) afirmam que a inibição do crescimento de halos cloróticos de fungos do gênero *Puccinia* sp. é essencial pois assim pode evitar a queda prematura da folha o que pode ocasionar uma alta pressão no hospedeiro.

Evitar o crescimento progressivo, em se tratando de fungos, é fazer com que os urediniósporos não possam emergir causando a ruptura da epiderme foliar como pústulas agravando a infecção. (SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018).

O diâmetro final médio foi maior no Grupo Controle, com 3,7 mm (±0,16) (figura 5), a ANOVA indicou uma diferença significativa entre as médias dos diâmetros finais dos tratamentos (p = 0.001011), após o teste de Tukey, observou-se que as diferenças eram entre o GC e os tratamentos T2 (p=0,00477) e T3 (p=0,0026).

Figura 4 – Diâmetro final dos tratamentos.



Fonte: Autores (2024).

Em se tratando do gênero *Puccinia*, Carnegie *et al.* (2016) trabalhando com *Puccinia psidii*, afirmaram que um ponto que se deve ter atenção no controle desse gênero é na redução da área de infecção, haja vista que quanto maior a superfície de ocupação do fungo, menor é a área fotossintética da planta.

As ferrugens podem afetar a aptidão das plantas hospedeiras de várias maneiras, como reduzir a produção de sementes do hospedeiro e o crescimento devido a uma mudança da alocação de nutrientes após a infecção (SALAMA *et al.*, 2010).

Esse resultado indica que T2 (1.0 mg/ml) e T3 (1.5 mg/ml), podem afetar o desenvolvimento de *P. xanthii*, com isso essas concentrações possuem as melhores chances de impedir o crescimento da infecção e consequentemente a progressão da doença. Com base nessas observações, pode-se depreender que essas frações do extrato hexânico de *N. undulata* apresentam atividade antifúngica do tipo fungistática, apresentando potencial mitigador no impacto dessa doença na cultura do Jambu.

Impedir o crescimento do patógenos, principalmente aqueles que afetam a produtividade é de fundamental importância para o controle da doença além de reduzir influência na reprodução dos hospedeiros (GILBERT, 2002).

No Brasil, até o momento, não foi publicado nenhum estudo que demonstre atividade antifúngica de briófitas, e por ser o primeiro estudo sobre atividade biológica com essa espécie de briófita, projetos que busquem elucidar os mecanismos, a etapa do ciclo de vida e compostos responsáveis por essa atividade antifúngica do extrato tornam-se imperativos.

**4. CONCLUSÃO**

Os dados desse trabalho trazem mais evidências sobre a atividade biológica de briófitas, sobretudo contra fungos, a ferrugem do Jambu apresentou uma alta severidade, os extratos apresentaram diferenças em suas capacidades de controle sobre o patógeno, tanto na inibição quanto no diâmetro final.

Os Tratamento 2 e 3 (1.0 mg/ml e 1.5 mg/ml, respectivamente), apresentaram os melhores resultados de inibição e diâmetros finais, com diferenças significativas em relação ao GC, indicando que essas concentrações podem ser mais eficientes no controle do fitopatógeno e indicadas para bioprospecção. Esses resultados também evidenciam o tipo de ação antifúngica dos extratos de briófitas, que podem ser classificados como fungistática.

**REFERÊNCIA**

APARECIDO, C. C.; PASSADOR, M. M. **Estudos biológicos de espécies de Puccinia utilizando “Germinatélios”**. Bioscience Journal, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, p. 440–447, 2014.

BANDYOPADHYAY, A.; DEY, A. **The ethno-medicinal and pharmaceutical attributes of Bryophytes**: A reviewPhytomedicine PlusElsevier, 1 maio 2022.

BEHAR, L., YANO, O., & VALLANDRO, G. C. (1992**). BRIÓFITAS DA RESTINGA DE SETIBA, GUARAPARI, ESPIRITO SANTO**. Bol. Mus. Biol. Mello Leitão, 1(1), 25–38.

BORGES, L. DA S. et al. **Produtividade e acúmulo de nutrientes em plantas de jambu, sob adubação orgânica e mineral**. Semina:Ciencias Agrarias, v. 34, n. 1, p. 83–94, 2013.

CARNEGIE, A. J. et al. **Impact of the invasive rust Puccinia psidii (myrtle rust) on native Myrtaceae in natural ecosystems in Australia**. Biological Invasions, v. 18, n. 1, p. 127–144, 2016.

CHEN, S. S.; SPIRO, M. **Study of microwave extraction of essential oil constituents from plant materials**. Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy, v. 29, n. 4, p. 231–241, 1994.

COMMISSO, M. et al. **Bryo-activities**: A review on how bryophytes are contributing to the arsenal of natural bioactive compounds against fungi. Plants, v. 10, n. 2, p. 1–28, 2021.

COSTA, D. P.; PERALTA, D. F. **Bryophytes diversity in Brazil**. Rodriguesia, v. 66, n. 4, p. 1063–1071, 2015.

DEVELOPMENT, R. RStudio, R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2017.

FLORSCHÜTZ, P. (1964). **mosses of Suriname**. In Flora of Suriname (pp. 1–271).

GILBERT, G. S. **Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems**. Annual Review of Phytopathology, v. 40, p. 13–43, 2002.

HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. **Breeding for resistance to soybean rust**. Plant Disease, v. 89, n. 6, p. 664–666, 2005.

HOMMA, A. K. O. et al. **Etnocultivo do jambu para abastecimento da cidade de belém, estado do pará**. Amazônia: Ci. & Desenv., v. 6, n. 12, p. 125–142, 2011.

JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. **Escala de Notas para Quantificação da Ferrugem em Eucalyptus**. Fitopatol. bras., v. 28, n. 2, p. 184–188, 2003.

LOPES, D. B.; BERGER, R. D. **The effects of rust and anthracnose on the photosynthetic competence of diseased bean leaves**. Phytopathology, v. 91, n. 2, p. 212–220, 2001.

MARKHAM, K.; CHALK, T.; STEWART-JUNIOR, C. N. **Evaluation of Fern and Moss Protein‐Based Defenses Against Phytophagous Insects**. Int. J. Plant Sci., v. 167, n. 1, p. 111–117, 2006.

MARTE, M.; MONTALBINI, P. **Histological observations on Uromyces phaseoli and Puccinia recondita infection in allopurinol-treated susceptible plants**. Journal of Phytopathology, v. 147, n. 3, p. 163–168, mar. 1999.

MARTINS, A. L. U. et al. **Agroecosystems, Landscapes and Knowledge of Family Farmers from Aramaçá Island, Upper Solimões Region, Amazon.** Agricultural Sciences, v. 09, n. 10, p. 1369–1387, 2018.

MIRANDA, T. G. et al. **Volatile concentrate from the neotropical moss Neckeropsis undulata (Hedw.) Reichardt, existing in the brazilian Amazon**. BMC Chemistry, v. 15, n. 1, p. 3–7, 2021.

MIRANDA, T. G. et al. **Atividade antifúngica de briófitas**: um estudo cienciométrico. Research, Society and Development, v. 11, n. 4, p. e10111427127, 12 mar. 2022.

OKULL, D. O.; BEELMAN, R. B.; GOURAMA, H. **Antifungal activity of 10-oxo-trans-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol against Penicillium expansum in potato dextrose agar medium**. Journal of Food Protection, v. 66, n. 8, p. 1503–1505, 1 ago. 2003.

POLTRONIERI, M. C.; POLTRONIERI, L. S.; MÜLLER, N. R. M. **CULTIVO DO JAMBU (Spilanthes oleracea L.)**. Embrapa Amazônia Oriental-Outras publicações técnicas (INFOTECA-E), v. 0, n. 39, p. 1–6, 1998.

ROBERT, C. et al. **Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status**. New Phytologist, v. 165, n. 1, p. 227–241, jan. 2005.

SALAMA, N. K. G. et al. **The suppression of reproduction of tragopogon pratensis infected by the rust fungus puccinia hysterium**. Fungal Ecology, v. 3, n. 4, p. 406–408, 2010.

SAXENA, D. K.; HARINDER. **Uses of bryophytes**. Resonance, v. 9, n. 6, p. 56–65, 2004.

SEPHTON-CLARK, P. C. S.; VOELZ, K. **Spore Germination of Pathogenic Filamentous**

**Fungi. In: Advances in Applied Microbiology**. [s.l: s.n.]. v. 102p. 117–157.

SEPHTON-CLARK, P. C. S., & VOELZ, K. (2018). **Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi**. In Advances in Applied Microbiology (Vol. 102, pp. 117–157).

SHAHOVEISI, F., TAHERI GORJI, H., SHAHABI, S., HOSSEINIRAD, S., MARKELL, S., & VASEFI, F. (2023). **Application of image processing and transfer learning for the detection of rust disease**. Scientific Reports 2023 13:1, 13(1), 1–12.

WANG, C. et al**. Characterization of Volatile Organic Compounds Produced by Bacillus siamensis YJ15 and Their Antifungal Activity Against Botrytis cinerea**. Plant Disease, v. 106, n. 9, p. 2321–2329, 1 set. 2022.

YANO, O. Briófitas. In: FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. (Ed.). . **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1984. p. 27–30.