



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CAAPEBA CHEIROSA (*Piper marginatum* Jacq.)
ANTAGONISTAS A *Colletotrichum guaranicola*, PATÓGENO DE
GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* Kunth ex H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)

BOLSISTA: Natalia Sarmanho Monteiro Lima, FAPEAM

UFAM

Manaus/AM
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-A /0151/2013

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CAAPEBA CHEIROSA (*Piper marginatum* Jacq.)
ANTAGONISTAS A *Colletotrichum guaranicola*, PATÓGENO DE
GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* Kunth ex H.B.K. VAR. *SORBILIS* (Mart.)
Ducke)

Bolsista: Natalia Sarmanho Monteiro Lima, FAPEAM

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Manaus/AM
2014

Todos os direitos deste Relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e aos seus autores. Parte deste Relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias.

RESUMO

A antracnose é a principal doença fúngica das plantas tropicais e a mais importante doença do guaranazeiro. A caapeba cheirosa (*Piper marginatum* Jacq.) é muito usada na cultura popular de maneira medicinal para picadas de insetos e suas propriedades alelopáticas são de interesse ecológico e agrônomico. Sendo assim o presente trabalho tem como objetivo encontrar fungos endófitos de caapeba cheirosa com antagonismo a antracnose. Foram realizados três testes de verificação de potencial antagonista: (1) Cultura Pareada: um disco de micélio de 5 mm de diâmetro do antagonista e do patógeno foram inoculados em placas de 9 cm de diâmetro. Em pontos equidistantes da borda da placa e em lados opostos. Após sete dias foi medido o crescimento da colônia do patógeno e adicionalmente feita uma classificação de notas conforme o grau de antagonismo; (2) Metabólito não voláteis: discos de papel celofane esterilizado, um pouco maior que o diâmetro da placa, foram sobrepostos em placas de Petri contendo meio BDA. Um disco de meio BDA, de 5 mm de diâmetro, com micélio e esporos dos possíveis antagonistas foram inoculados no centro das placas, sobre o papel celofane. Após 48 h o disco foi retirado juntamente com o papel celofane e inoculado um disco de 5mm do patógeno. Após sete dias foi medido o diâmetro da colônia do patógeno. (3) Metabólito voláteis:foi inoculado um disco de micélio de 5 mm de diâmetro do antagonista e do patógeno em placas diferentes com meio BDA. Em seguida os fundos das placas foram colocados sobrepostos, e entre ele um disco de papel celofane autoclavado, com o diâmetro um pouco maior que o da placa. Todos os testes foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados do crescimento micelial das colônias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade. Os isolados testados por cultura pareada diferiram do controle, porém os melhores foram P5e, P1d e P9c. Referente à produção de metabólitos não voláteis o isolado P7b obteve resultado satisfatório, inibindo praticamente 50% do crescimento do patógeno. Os isolados P1c e P1d apresentaram potencial controle de *C. guaranicola* via produção de metabólitos voláteis. Os isolados P11b e P7 foram demonstraram maior capacidade de controle de *C. guaranicola*, via obtenção de metabólitos secundários,tendo resultados satisfatórios em ambos os testes, sendo necessários estudos posteriores.

Palavras chave: controle biológico, antibiose, *Trichoderma* sp.

1 INTRODUÇÃO

A antracnose é a principal doença fúngica das plantas tropicais. É causada pelo complexo fúngico do gênero *Colletotrichum* (teleomorfo: *Glomerella* sp.), e seus sintomas são manchas depressivas e escuras e encarquilhamento das folhas. A antracnose é a doença mais importante do guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunth ex H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) reduzindo a produção.

Diversas plantas possuem capacidade inseticida, fungicida e bactericida, entre elas destacam-se as do gênero *Piper*. A caapeba cheirosa (*Piper marginatum* Jacq.) é muito usada na cultura popular de maneira medicinal para picadas de insetos e suas propriedades alelopáticas são de interesse ecológico e agrônômico. Das folhas e inflorescências é extraído o óleo essencial que possui comprovada capacidade anti fungicida.

O controle biológico é uma forma de diminuir a população de pragas de forma natural, umas das maneiras é a utilização de antagonistas às pragas ou doenças. Diversos micro-organismos possuem propriedades antagônicas a outros micro-organismos patogênicos, por isso a importância do estudo em relação às formas de controle biológico de pragas e doenças de plantas tem avançado. Sendo assim o presente trabalho teve como objetivo encontrar fungos endófitos de caapeba cheirosa com ação antagônica a *C. guaranicola*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial antagônico de fungos endofíticos isolados de caapeba cheirosa frente ao fitopatógeno *C. guaranicola*.

2.2 Específicos

Avaliar a atividade antagônica de fungos endofíticos frente a *C. guaranicola* pela confrontação direta;

Avaliar fungos endofíticos com atividade antagônica a *C. guaranicola* pela produção de metabólitos não voláteis;

Avaliar fungos endofíticos com atividade antagônica a *C. guaranicola* pela produção de metabólitos voláteis;

Identificar os fungos endofíticos que apresentarem atividade antagônica frente a *C. guaranicola*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Micro-organismos endofíticos são conceituados como aqueles que habitam parte ou todo o seu ciclo biológico albergados em plantas e não implicam na expressão de sintomas (ASSAKURA et al., 2009). Assim sendo, habitam um nicho ecológico onde por vezes pode haver competição com os fitopatógenos, nesse caso, os endófitos podem produzir metabólitos biologicamente ativos com atuação antagônica aos agentes causais.

As doenças de plantas, principalmente causadas por patógenos são responsáveis por perdas severas em culturas de importância econômica em todo o mundo. Os insumos químicos têm causado impactos negativos nos mais diferentes campos dos ecossistemas, representados por contaminação das águas, resíduos químicos no solo, efeitos nos micro-organismos, danos à saúde humana e dificuldades da ciclagem de resíduos químicos em ambientes protegidos (FRIGHETTO, 2000; ETHUR et al., 2007).

Nesse sentido, o controle biológico se constitui em demanda atual e de alta importância para viabilizar a substituição dos agroquímicos. Uma alternativa para o controle de fitopatógenos é o uso de micro-organismos antagonistas, os quais oferecem potencialmente respostas para muitos problemas enfrentados na agricultura.

Nos últimos anos aumentaram as pesquisas buscando conhecer a biota endofítica de plantas tropicais (ALMEIDA et al., 2005; ALBERTO et al., 2009; ALBERTO et al., 2011). A comunidade de fungos endofíticos pode variar de acordo com a planta hospedeira, do clima, da idade da planta, o tempo gasto para ser feito o isolamento e outros fatores (PEIXOTO-NETO et al., 2004).

Várias espécies de *Trichoderma* são capazes de secretar metabólitos secundários tóxicos a fitopatógenos, sendo essa característica variável em função da linhagem (HANDELSMAN e STABB, 1996). Há evidências de que em condições de laboratório, estes fungos sejam capazes de produzir antibióticos que exerçam efeitos contra bactérias e fungos (MELO, 1996).

Os endófitos apresentam ainda outra característica interessante, é a promoção de crescimento vegetal pela síntese de fitormônios e fixação de nitrogênio (PEIXOTO-NETO et al., 2002). A interação de um fungo com seu hospedeiro vegetal varia e depende da planta. A colonização pode ser sistêmica ou local, inter ou intracelular. Os fungos endofíticos que colonizam seus hospedeiros assintomaticamente (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007) são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes.

A identificação e seleção efetiva de antagonismo entre micro-organismos é o primeiro passo para o controle biológico. Assim, a técnica da cultura pareada que visa em meio de cultura, estabelecer relações competitivas semelhantes às encontradas na natureza, fornece indícios da aplicabilidade destes fungos no controle de fitopatógenos (KAMALAKANNAN et al., 2004).

A antracnose do guaranazeiro é uma doença causada pelo fungo *C. guaranicola*, o qual ataca a planta em qualquer estágio de desenvolvimento de forma altamente destrutiva. Nas plantas atacadas, o fungo induz o crestamento (queima) em folhas jovens, com sua subsequente queda. Em folhas novas, ainda em crescimento e antes da maturidade, os sintomas são lesões necróticas com formato variável de circular a elíptico. Quando numerosas, essas lesões causam deformações e enrolamento das folhas, principalmente quando atingem as nervuras. Folhas maduras ou velhas não são infectadas.

Ataques sucessivos deste fungo induzem a morte descendentes dos ramos e por fim a da planta. O controle da antracnose pode ser obtido pelo emprego de pelo menos três estratégias: utilização de clones com altos níveis de resistência estável, aplicações regulares de fungicidas e redução de severidade de doença mediante utilização de podas em épocas pré-definidas.

Assim, fungos endofíticos com o potencial de controlar fungos fitopatogênicos pode ser uma alternativa no controle de doenças, minimizando impactos causados pelo uso de produtos agroquímicos no ambiente, tornando-se como uma alternativa natural de biocontrole. A prevenção da infecção, redução da colonização, diminuição da esporulação ou da sobrevivência do

patógeno podem proporcionar diferentes níveis de controle através da utilização de micro-organismos antagônicos (PUNJA e UTKHEDE, 2003).

Diversos estudos tem sido realizados utilizando micro-organismos endofíticos no controle biológico de patógenos (CORRÊA, 2008; SANTOS e VARAVALLO, 2011). Rocha et al. (2009) verificaram se linhagens de fungos endofíticos do confrei (*Symphytum officinale* L.) possuíam a capacidade de antagonismo frente ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, o fungo causador do mofo branco, conseguiram até 50% de inibição do micélio do fitopatógeno.

Piper marginatum é uma erva pertencente ao gênero *Piper*, família Piperaceae. Possui poder aromático, e propriedades medicinais como antisséptico, antiinflamatório e anti-hemorragico (AUSTRAN et al., 2009; SANCHÉZ et al., 2011). O extrato de suas folhas possuem grandes quantidades de óleos essenciais. Sanchez et al. (2011) testaram a capacidade antimicrobiana desse óleo frente a *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson, *X. campestris* pv *campestris* (Pammel) Dawson, *Pseudomonas solanacearum* Smith, *P. celebensis* Gaumann, *P. syzygii* Roberts et al., *P. fluorescens* Migula e *Alternaria solani* Sor, mostrando-se eficiente contra *A. solani*, *X. albilineans* e *X. campestris* pv *campestris*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras

Os fungos utilizados nos testes foram isolados de plantas de caapeba cheirosa e fazem parte da coleção do Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana/ LPBOM-UFAM. O fitopatógeno *C. guaranicola* foi isolado de guaranazeiro com sintomas de antracnose.

4.2 Antagonismo por confrontação direta

O teste foi realizado conforme a metodologia descrita por Dennis e Webster (1971). Um disco de micélio de 5 mm de diâmetro do antagonista e do patógeno foram inoculados em placas de 9 cm de diâmetro. Em pontos equidistantes da borda da placa e em lados opostos. Os endófitos do gênero *Trichoderma* por apresentarem crescimento mais acelerado, foram inoculados dois dias depois do patógeno. O experimento foi inteiramente casualizado, com três repetições e um controle. Após sete dias foram feitas as avaliações, que consistiram na medição do diâmetro da colônia do patógeno. Os dados do crescimento micelial das colônias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade.

Adicionalmente foi realizada a classificação do potencial antagônico de acordo com a escala descrita por Bell et al. (1982). Onde o grau de antagonismo, foi classificado em função de uma divisão de cinco classes de notas: Nota 1: Antagonista cobrindo toda a superfície da placa de Petri; Nota 2: Antagonista cobrindo pelo menos 2/3 da superfície; Nota 3: Antagonista cobrindo pelo menos 50% da superfície; Nota 4: Patógeno cobrindo ao menos 2/3 da superfície; Nota 5: Patógeno cobrindo a totalidade da superfície, anulando o antagonista.

4.3 Antagonismo por produção de metabólitos não voláteis

A avaliação da produção de metabólitos não voláteis pelos antagonistas foi realizada pelo método do papel celofane (GIBBS (1967), citado por MARIANO, 1993). Discos de papel celofane esterilizado, com diâmetro de uma placa e com sobra de 0,5 cm nas laterais, foram sobrepostos em placas de Petri contendo meio BDA. Um disco de meio BDA, de 5 mm de diâmetro, com micélio e esporos dos possíveis antagonistas, crescidos em meio BDA por sete dias, foram inoculados no centro das placas, sobre o papel celofane. Após 48 horas o disco foi retirado juntamente com o papel celofane.

Um disco de micélio retirado da borda das colônias de *C. guaranicola*, cultivados em meio BDA, incubadas por sete dias em câmara BOD a 25 °C, foi inoculado no centro da placa contendo os metabólitos não voláteis do possível antagonista. As placas foram incubadas a ± 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias de incubação, foi observado o crescimento do fitopatógeno e medido o diâmetro (cm) da colônia. A testemunha foi a colônia do *C. guaranicola* inoculada em meio BDA. O experimento foi inteiramente casualizado com três repetições. Os dados do crescimento micelial das colônias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade.

4.4 Antagonismo por produção de metabólitos voláteis

O teste para a avaliação de metabólitos voláteis consistiu em inocular um disco de micélio de 5 mm de diâmetro do antagonista e do patógenos em placas diferentes com meio BDA. Em seguida os fundos das placas foram colocados sobrepostos, e entre ele um disco de papel celofane autoclavado, com o diâmetro um pouco maior que o da placa. O experimento foi realizado em triplicata, e as placas foram vedadas com filme plástico. O experimento foi inteiramente casualizado. O controle consistiu em inocular somente um disco do patógeno em uma placa com meio BDA.

A avaliação foi realizada mediante a medição da colônia do patógeno após sete dias do início do teste. Os dados do crescimento micelial das colônias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram reativados 50 isolados, porém em razão da contaminação dos estoques, os testes foram realizados com 25, dos quais a maioria era do gênero *Trichoderma*, sendo assim 35% *Trichoderma* sp., 18% *T.harzianum*, 9% *Xylaria* sp., 5% *Aspergillus* sp., *T. spirale* e *T. cerinum* e 23% N.I (não identificado).

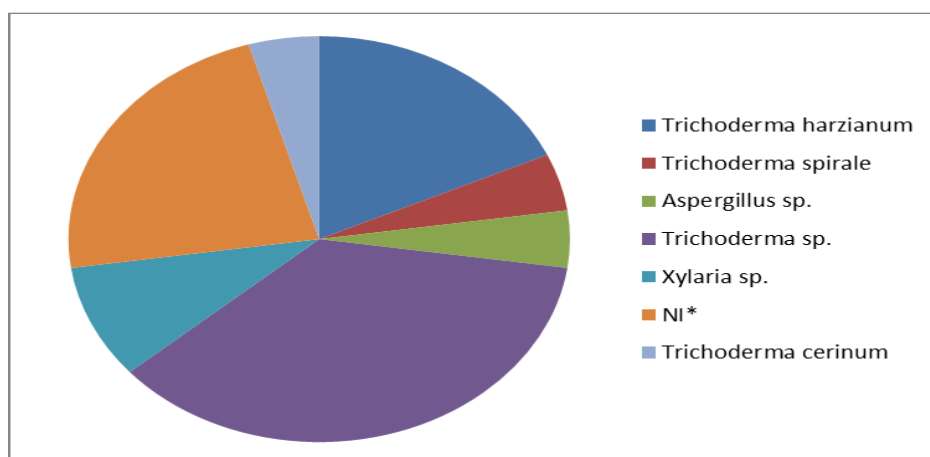


Figura 1. Diversidade de fungos endófitos de *Piper marginatum* utilizados nos testes de antagonismo frente ao fitopatogeno *Colletotrichum guaranicola*
*NI: não identificado

5.1 Antagonismo por cultura pareada

No teste de antagonismo por cultura pareada, os isolados que apresentaram melhores resultados foram do gênero *Trichoderma*. Os isolados apresentaram diferenças significativas, principalmente quando comparados com o controle (Tabela 1). Os melhores tratamentos foram P5e (*Trichoderma* sp.), P1d (*T. harzianum*) e P9c (*T. harzianum*) com 48%, 46,6% e 46,6% de inibição contra *C. guaranicola*. O isolado P8a (*Xylaria* sp.) foi o que apresentou menor percentual de inibição, com 25%. Silva et al. (2008) encontraram resultados diferentes em relação ao isolado de *T. harzianum*, no teste de cultura pareada foi o que apresentou menor percentual de inibição contra *Phytophthora citrophthora* e não diferiu estatisticamente do controle. Para

Bonett et al. (2013) todos os isolados de *Trichoderma* sp. foram capazes de inibir o crescimento de *C. musae* pelo teste de cultura pareada.

Tabela 1. Médias do crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola* e percentual de inibição dos endófitos de *Piper marginatum* no teste de cultura pareada

Isolados	Médias de crescimento micelial (cm)*	% de inibição
P1a	4.20 d	44%
P1c	4.50 d	40%
P1d	4.07 d	46,6%
P1e	4.23 d	44%
P4a	4.17 d	45,3%
P4b	4.67 c	38,6%
P4c	4.10 d	45,3%
P5a/09	4.50 d	40%
P5c	4.10 d	45,3%
P5d	4.17 d	45,3%
P6a1/09	4.80 c	36%
P6d	4.33 d	42,6%
P6f2/09	5.27 b	30,6%
P6f1/09	4.83 c	36%
P6g/09	4.63 c	38,6%
P7a/09	4.83 c	36%
P7b	4.33 d	38,6%
P7c	5.17 b	32%
P7d	4.23 d	44%
P9c	4.07 d	46,6%
P11b	4.37 d	42,6%
P11d	4.50 d	40%
P8a	5.60 b	25%
P9b	4.40 d	41%
P5e	3.90 d	48%
Controle	7.50... a	0%

* Valores seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott (P<0,05)

Segundo a escala de Bell et al. (1982) somente o isolado P6a1/09 isolado recebeu a nota 4 (Figura 2), os demais apresentaram nota satisfatória 2 e 3 e nenhum apresentou a nota 5 da escala. O isolado P11b (*Trichoderma* sp.) apresentou o melhor resultado, com nota 1 segundo a escala (Tabela 2). Resultado semelhante foi obtido por Isaias et al. (2014) com *T. harzianum* no controle de *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*, que obteve nota 1 para os dois patógenos, os demais isolados testados mostraram-se mais eficientes somente contra *V. dahliae*, onde um apresentou nota 4 (*T. spirale*).

Tabela 2. Classificação dos isolados endófitos de *Piper marginatum* conforme a escala de Bell et al. (1982) frente ao fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola*

Isolados	Nota conforme a escala *
P1a	2
P1c	2
P1d	2
P1e	2
P4a	2
P4b	3
P4c	2
P5a/09	3
P5c	2
P5d	2
P6a1/09	2
P6d	2
P6f2/09	4
P6f1/09	3
P6g/09	3
P7a/09	3
P7b	2
P7c	4
P7d	2
P9c	2
P11b	1
P11d	3
P8a	3
P9b	2
P5e	2

*Nota 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Nota 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Nota 3: *Trichoderma* ocupa aproximadamente metade da superfície do meio; Nota 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Nota 5: O patógeno cresce sobre o *Trichoderma* e ocupa toda a superfície do meio

Louzada et al. (2009), testaram 230 isolados do gênero *Trichoderma* contra *Fusarium solani* e *S. sclerotiorum*, e destes, 50 obtiveram notas menores que 3 conforme a escala de Bell et al. (1982) contra *F. solani* e 111 contra *S. sclerotiorum*. Em avaliação *in vitro* de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* spp., Milanesi (2014) encontrou notas segundo a escala Bell et al. (1982) de 1-2, mostrando a eficiência do antagonista.

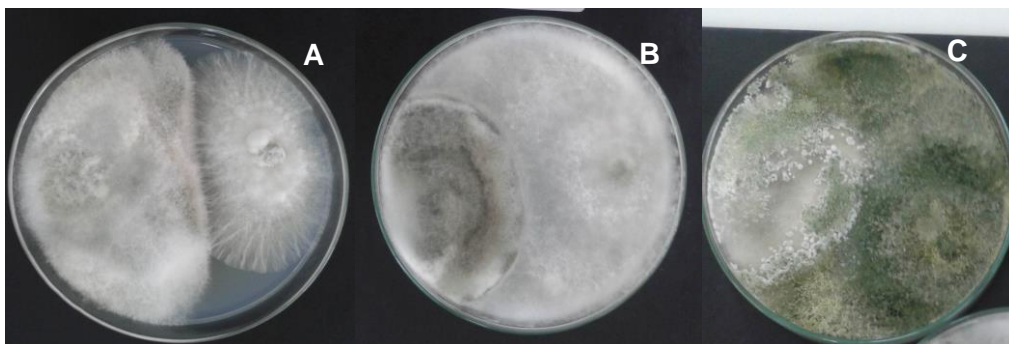


Figura 2. Teste de cultura pareada com os isolados: NI (não identificado) P6a1/09 (A) nota 4; B e C – *Trichoderma* sp. (P11b) nota 1, classificação de acordo com a escala deBell et al. (1982)

5.2 Antagonismo por produção de metabólitos não voláteis

A avaliação da produção de metabólitos não voláteis, mostrou que somente os isolados P7b (*T. harzianum*) e P5a/09 (*Aspergillus* sp.) apresentaram resultado com 48% de inibição contra o fitopatógeno. Os demais isolados, apenas sete (P1d, P7c, P9b, P11d, P5c, P11b e P5d) diferiram estatisticamente do controle, e o percentual de inibição não ultrapassou 35% (Figura 3 e Tabela 3).

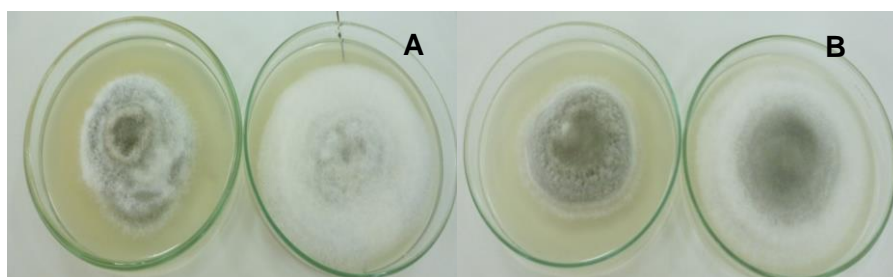


Figura 3. Teste de metabólitos não voláteis dos isolados: A - *Xylaria* sp. (P6f1/09); B – NI (não identificado) P6f2/09 frente ao fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola*

Àvila et al. (2005) testaram isolados de *Trichoderma* spp. contra *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, entre os antagonistas testados os melhores resultados foram de isolados *T. harzianum* que conseguiram inibir o crescimento dos fitopatógenos por meio de metabólitos não voláteis em até 100%. Enquanto Amin et al. (2010) testaram o *T. harzianum* contra diversos fitopatógenos e observaram 53,68% de inibição ao *C. capsici*.

Tabela 3. Médias do crescimento micelial e percentual de inibição de *C. guaranicola* (patógeno) no teste de metabólitos não voláteis

Isolados	Médias de crescimento micelial (cm)	% de inibição
P1a	7.17 a	7,7%
P1d	6.23 b	19,4%
P1e	8.23 a	6,5%
P4a	7.93 a	-2,6%
P4b	7.67 a	1,3%
P4c	8.23 a	-6,5%
P5e	8.13 a	-5,2%
P6a1/09	8.33 a	-7,8%
P6d	7.83 a	-1,2%
P6f1/09	6.83 a	11%
P6f2/09	6.77 a	3,8%
P6g/09	7.53 a	2,5%
P7a/09	7.43 a	3,8%
P7c	6.03 b	22,8%
P7d	7.50 a	2,5%
P9c	6.73 a	12,2%
P1c	7.73 a	0%
P8a	7.50 a	2,5%
P9b	5.00 b	35%
P11d	5.10 b	33,71%
P7b	4.00 c	48%
P5c	5.07 b	35%
P11b	5.17 b	33,7%
P5a/09	4.00 c	48%
P5d	5.23 b	32,4%
Controle	7.70 a	0%

5.3 Antagonismo por produção de metabólitos voláteis

Dentre os isolados testados para o teste de antagonismo por metabólitos voláteis, os melhores resultados foram dos endófitos P1c e P1d (Figura 4), ambos conseguiram inibir o crescimento do fitopatógeno em 38,7% (Tabela 4). Carvalho et al. (2011) testaram a produção de metabólitos voláteis por isolados de *T. harzianum* no controle de *F. oxysporum*, e todos os isolados apresentaram produção de metabólitos com valores próximos a 50% de inibição. Pereira (2009) testou três isolados de *Trichoderma* sp. contra isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, e todos *Trichoderma* sp. foram capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno em 120 horas.

Tabela 4. Médias do crescimento micelial de *C. guaranicola* (fitopatígeno) e percentual de inibição dos endófitos de *Piper marginatum* no teste de metabólitos voláteis

Isolados	Médias de crescimento micelial (cm)	% de inibição
P1a	8.30 a	4%
P1e	8.67 a	0%
P1d	5.33 b	38,7%
P4a	7.50 a	13,3%
P4c	5.50 b	36,4%
P4b	7.50 a	13,2%
P5c	7.73 a	10%
P5d	8.00 a	7,5%
P6d	7.33 a	15,6%
P6a1/09	7.33 a	15,6%
P6f1/09	7.50 a	13,3%
P6g/09	7.33 a	15,6%
P7a/09	8.27 a	5,20%
P7b	6.40 b	26%
P7c	7.60 a	12,1%
P7d	7.50 a	13,3%
P9c	8.00 a	7,5%
P5e	7.33 a	15,6%
P11d	8.00 a	7,5%
P1c	5.37 b	38,7%
P8a/09	6.83 a	18,7%
P9b	7.10 a	17,9%
P11b	6.20 b	28,3%
P5a/09	7.47 a	14,4%
P6f2/09	7.83 a	9,8%
Controle	8.65 a	0%

Isaias et al. (2014) verificaram que metabólitos produzidos pelos isolados CEN725 (*T. harzianum*), CEN776 (*T. koningiopsis*) e CEN786 (*T. asperellum*) apresentaram inibição de *S. rolfsii* significativamente superior a 60%, quanto a *V. dahliae*, todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados mostraram desempenho semelhante, com ação inibitória próximo a 80%.

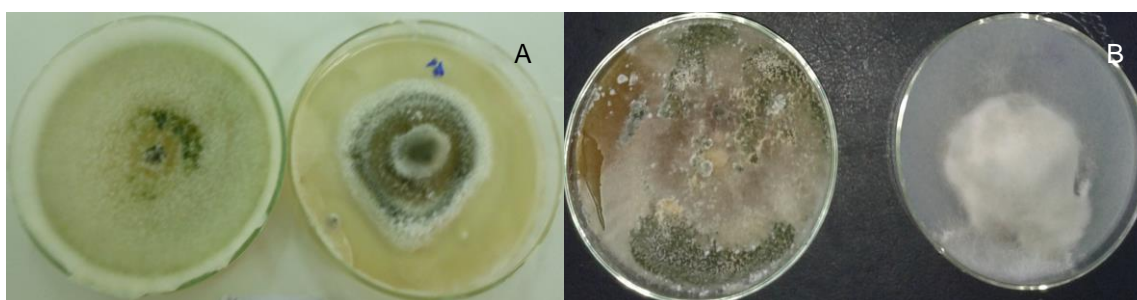


Figura 4. Teste de metabólitos voláteis dos isolados: A – *Trichoderma harzianum* (P1c); B – *T. harzianum* (P1d) frente ao fitopatígeno *Colletotrichum guaranicola*

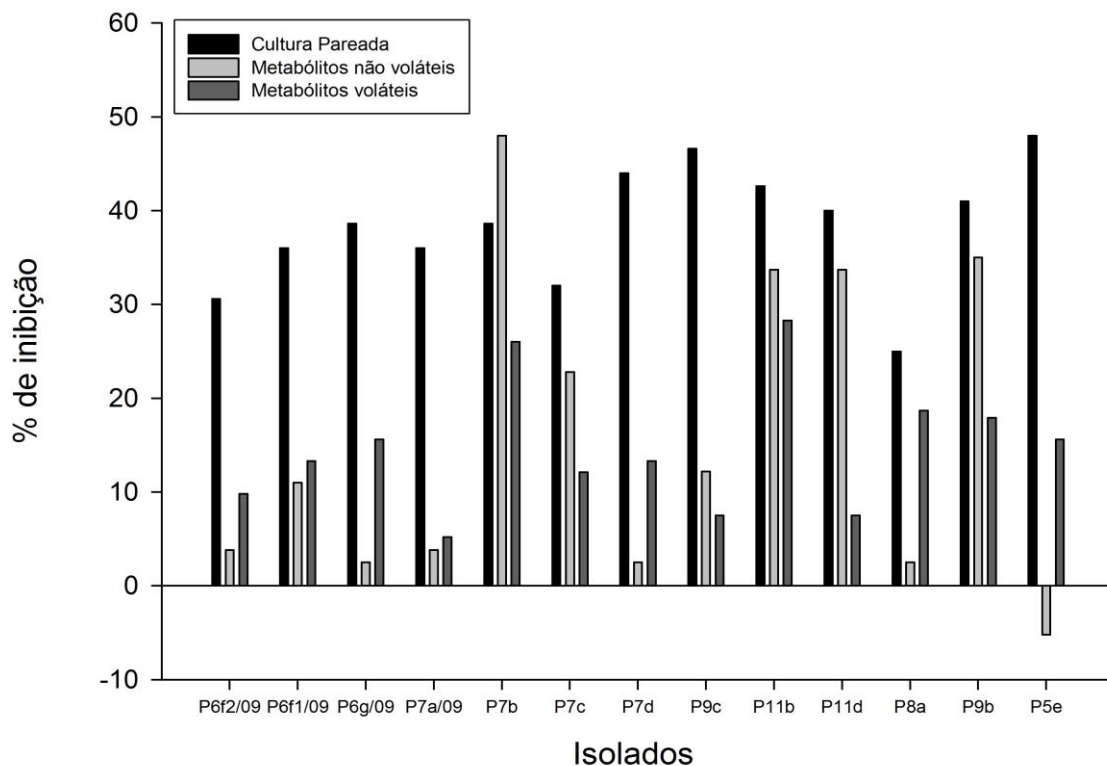
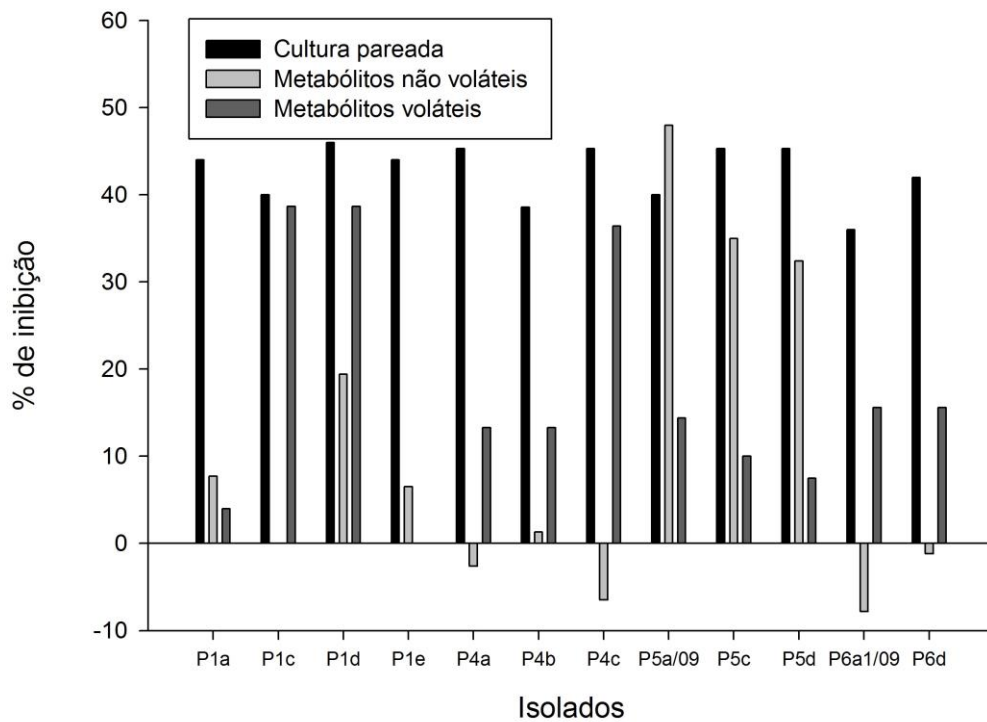


Figura 5. Capacidade de inibição dos endófitos de *Piper marginatum* frente à *Colletotrichum guaranicola* pela produção de metabólitos não voláteis, metabólitos voláteis e cultura pareada

A maioria dos isolados mostraram capacidade de controlar *C. guaranicola* nas três formas de antagonismo, porém alguns apresentaram baixa ou negativa percentagem de inibição (Figura 5). Tais resultados podem demonstrar a capacidade dos fungos endófitos de caapeba cheirosa de exercerem outras formas de antagonismo. Dentre todos as espécies de endófitos testados, os isolados de *Trichoderma* spp. foram os que demonstraram maior capacidade antagônica.

Os que apresentaram resultados satisfatórios em todas as avaliações foram, P11b (*Trichoderma* sp.) e P7b (*T. harzianum*). Segundo Bomfim et al. (2010), a menor ação antagônica dos demais isolados de *Trichoderma* sp. pode ser resultado de competição pelos nutrientes do meio, ou uma menor produção de protease e cisteína, que são enzimas produzidas pelo gênero que inativam a capacidade enzimática do fitopatógeno. O *T. harzianum* é o mais estudado em razão da sua satisfatória atividade antagônica (Carvalho et al., 2011; Ru e Di, 2012; Fan et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

Todos os isolados testados por cultura pareada diferiram do controle, porém os melhores foram P5e (*Trichoderma* sp.), P1d (*T. harzianum*) e P9c (*T. harzianum*).

Na produção de metabólitos não voláteis o isolado P7b (*T. harzianum*) foi o que obteve resultado satisfatório, inibindo praticamente 50% do crescimento do patógeno.

Os isolados P1c e P1d (ambos *T. harzianum*) apresentaram potencial controle de *C. guaranicola* via produção de metabólitos voláteis.

Dentre os três testes de antagonismo os isolados P11b (*Trichoderma* sp.) e P7b (*T. harzianum*) apresentaram maior capacidade de controlar o fitopatógeno *C. guaranicola*.

7 REFERÊNCIAS

ALBERTO, R.N. et al. Avaliação de metabólitos de isolado endofítico de *Sapindus saponária* no controle de patógenos. In: VI Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Anais do ..., Maringá, 2009.

ALBERTO, R.N. et al. Identificação molecular e atividade antagonística de fungo endofítico de *Piper hispidum* contra os fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *Alternaria alternata*. In: XIII Encontro Maringaense de Biologia – XXVI Semana de Biologia, Anais do XIII BEM, Maringá, p. 13, 2011.

ALMEIDA, C.V. et al. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.

AMIN, F. et al Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro*. Journal of Phytology, Humnabad, v. 2, n. 10, p. 34–37, 2010.

ASSAKURA, A.H. et al. Obtenção de metabólitos do fungo endofítico 3-10.1.2 isolado de *Trichilia elegans* e seu uso potencial no controle de fitopatógenos. In: VI Encontro Internacional de Produção Científica CESUMAR, Anais do ..., Maringá, 2009.

AUSTRAN, E.S. et al. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Bioresource Technology n. 100, p. 2284–2288, 2009.

ÁVILA, Z.R. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfsi* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Embrapa Recursos Genéticos, Brasília. 30p. (Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa 177). 2005.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed). Fungi: Multifaceted microbes, Boca Raton, CRC press, p. 189-207, 2007.

BELL, D.K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, Saint Paul, Minnesota, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BOMFIM, M.P. *et al.* Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathol*, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.

BONETT, L. P. *et al.* Biocontrole *in Vitro* de *Colletotrichum musae* por isolados de *Trichoderma* spp. *UNICIÊNCIAS*, v. 17, n. 1, 2014.

CARVALHO, D. D.C. *et al.* Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. *Trop. plant pathol.*, Brasília , v. 36, n. 1, Feb. 2011 .

CORRÊA, A.S. Avaliação da microbiota endofítica de citros com potencial antagônico no controle biológico de *Guignardia citricarpa*. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Porto Alegre, UFRGS, 2008, 46 p.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society, Cambridge*, v. 57, p. 59-363. 1971.

ETHUR, L.Z. *et al.* Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 127-133, 2005.

ETHUR, L.Z. *et al.* Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 37, n. 6, p. 1794-1797, 2007.

FAN, H. *et al.* Functional analysis of a subtilisin-like serine protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 129-138, 2014.

FRIGHETTO, R.T.S. Análise da biomassa microbiana em carbono: Método de fumigação extração. In: FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. (Coords), *Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo*. Jaguariúna, EMBRAPA, p. 157-166, 2000.

HANDELSMAN. J.; STABB, E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell, American Society of Plant Physiologists*, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

ISAIAS, C. O. et al . Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfii* e *Verticillium dahliae*. *Summa phytopathol.*, Botucatu , v. 40, n. 1. 2014.

KAMALAKANNAN, A. et al. Biocontrol agents induce disease resistance in *Phyllanthus niruri* Linn against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 43, p. 187-194, 2004.

LOUZADA, G. A. S. et al . Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotrop.*, Campinas , v. 9, n. 3. 2009 .

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.

MILANESI, M.P. Aspectos biológicos da interação *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto. 2012. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Rurais , Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

PEIXOTO–NETO, P.A.S. et al. Microrganismos endofíticos em plantas: *Status* atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PEIXOTO-NETO, P.A.S. et al. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEREIRA, C.O.F. Estudo da patogenicidade e controle biológico de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

ROCHA, R. et al. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 73-78, 2009.

RU, Z.; DI, W. *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 18, p. 4180-4186, 2014.

SANCHÉZ, Y. et al. Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Rev. Protección Veg.* vol. 26 n. 3, p. 170-176, 2011.

SANTOS, T.T.; VARAVALLO, M.A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. *Biometrics*, Oxford, v. 30, n. 3, p. 502-512, 1974.

SILVA, K. S. et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina – PR, v. 29, n. 4, p.749-754, 2008.

8- CRONOGRAMA EXECUTADO

Nº	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
		2013					2014						
01	Revisão de literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
02	Reativação de micro-organismos	R	R	R									
03	Teste de confrontação direta			R	R	R							
04	Teste com metabólitos não voláteis				R	R	R						
05	Teste com metabólitos voláteis					R	R	R					
06	Elaboração do Relatório Parcial					R							
07	Identificação dos isolados							R	R	R			
08	Armazenamento dos isolados			R	R	R	R	R					
09	Elaboração do Resumo e Relatório Final										R	R	R
10	Preparação da apresentação final para o Congresso										R	R	R