

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

MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS AO GUARANAZEIRO  
(*Paullinia cupana var. sorbilis*) COMO POTENCIAIS AGENTES DE  
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Colletotrichum guaranicola* Albuq.

Bolsista: Geisa da Silva Crisostomo, CNPq.

MANAUS

2015

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

RELATÓRIO FINAL

PIB-A/0041/2014

MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS AO GUARANAZEIRO  
(*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) COMO POTENCIAIS AGENTES DE  
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque

Bolsista: Geisa da Silva Crisostomo, CNPq.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jânia Lília da Silva Bentes.

MANAUS

2015

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	04
2. INTRODUÇÃO.....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	05
3.1. Guaranazeiro .....	06
3.2. Controle biológico .....	07
3.3. Endofíticos e controle biológico.....	07
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	08
Local dos ensaios .....	08
Obtenção dos isolados de fungos.....	08
Screening de isolados com atividade inibidora .....	09
Avaliação do potencial dos isolados na inibição .....	09
5. RESULTADO FINAL .....	12
6. CONCLUSÃO.....	16
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17
8.CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	19

## 1. RESUMO

O controle biológico de patógenos pode ser considerado como a sua redução parcial ou a total por outros organismos e ocorre naturalmente em vários ambientes naturais. O uso de fungos no biocontrole de outros micro-organismos vem sendo muito estudado. Os isolados dos fungos foram obtidos a partir de plantas de guaranazeiro sem sintomas de antracnose, em áreas de cultivo no município de Maués - AM e na Embrapa - CPAA-AM. Foram coletadas amostras de folhas, ramos, flores, frutos e da rizosfera das plantas. E foi realizada uma seleção massal dos isolados obtidos visando identificar aqueles com potencial de inibição do crescimento micelial de *C. guaranicola* in vitro. A avaliação foi feita por meio da medição do halo de inibição formado entre a colônia do fitopatógeno e o potencial inibidor. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições, sendo cada unidade experimental uma placa de Petri. Os isolados que apresentaram melhor resultado neste ensaio foram avaliados pela técnica de pareamento de colônias. Obteve-se uma coleção de 32 isolados de fungos de diferentes partes de plantas de guaranazeiro. Constatou-se que os isolados endofíticos AG21 e AG22, mostram-se como possíveis estratégias para o controle de *C. guaranicola*, já que apresentaram halo de inibição do crescimento deste fitopatógeno durante o teste de cultura pareada, sendo estes microrganismos importantes por apresentarem propriedade para conferir proteção às plantas.

## 2. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos representa um dos principais métodos de controle de doenças em plantas. A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornaram amplamente difundidos em diversas culturas (Ghini e Kimati, 2002). No Amazonas o uso de defensivos químicos no manejo dos sistemas agrícolas, tanto em várzea quanto em terra-firme, tem sido frequente. O pouco conhecimento sobre o uso correto de defensivos e das medidas de segurança e proteção pela maioria dos agricultores, faz com que o risco de efeitos adversos à saúde humana e ao ambiente, relacionado ao uso destes produtos seja bastante alto (Waichman et al, 2002). O uso indiscriminado e abusivo de pesticidas e suas consequências, despertou nos últimos anos o interesse pela busca de métodos de controle, visando a substituição ou redução do uso destes produtos, por outros mais seguros, eficazes, e ecologicamente adequados. Neste sentido, há uma tendência mundial em explorar novas alternativas de controle de fitopatógenos, dando-se prioridade à utilização de substâncias naturais biologicamente ativas contra diferentes patógenos.

Estudos de bioprospecção de micro-organismos, tem grande interesse, visando à identificação de atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos problemáticos na região e que poderão futuramente, serem utilizadas como uma alternativa econômica e ecologicamente viável pelos produtores locais, bem como potenciais portadores de substâncias bioativas com interesse biotecnológico.

Este projeto está vinculado ao projeto Microoma, aprovado no edital Pró-Amazônia da CAPES, que prevê a bioprospecção de micro-organismos na cultura do guaranazeiro, e envolve a participação três universidades, UFAM, UFV e UFMT.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Guaranazeiro

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma dicotiledônea, pertencente à família Sapindaceae. O fruto é um dos mais importantes produtos do Estado do Amazonas, envolvendo pequenos agricultores e sendo fonte de renda direta e indireta de milhares de pessoas. Seu uso não se restringe ao mercado de bebidas, sendo usado em fármacos e cosméticos (EMBRAPA, 2006; Kitajima, 2010).

Na região Norte a condição de centro de diversificação da cultura de guaranazeiro, fez surgir, por coevolução, doenças que a afetam severamente em monocultivo, sendo a antracnose, causada pelo *Colletotrichum guaranicola*, a mais importante delas, que contribui para a baixa produtividade do guaranazeiro no Estado do Amazonas, atualmente em torno de 150 kg/ha, muito aquém do potencial da cultura, que pode facilmente atingir 600 kg/ha (EMBRAPA, 2007).

A doença afeta a planta em qualquer estágio de desenvolvimento de forma altamente destrutiva. Induz o crestamento (queima) em folhas jovens, com sua subsequente queda; lesões necróticas de coloração marrom-escura e contornos definidos em folhas ainda em expansão e em folhas maduras. O controle da antracnose do guaranazeiro pode ser obtido pelo uso de químicos, em associação com a poda fitossanitária em épocas adequadas.

Embora o controle químico ainda seja o método mais utilizado e considerado como o mais efetivo contra pragas e doenças, os problemas associados ao intenso uso de defensivos despertou o interesse pela busca de alternativas para a substituição ou redução do uso destes produtos.

### 3.2. Controle biológico

O controle biológico de patógenos pode ser considerado como a sua redução parcial ou a total por outros organismos e ocorre naturalmente em vários ambientes naturais (Agrios, 2005). O uso de fungos no biocontrole de outros micro-organismos vem sendo muito estudado (Auler et al., 2013; Costa e Santos, 2011; Infante et al., 2009;).

Araújo et al. (2011) estudaram o antagonismo in vitro de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* contra isolados do fungo *Colletotrichum gloesporioides* e verificaram que o fungo apresentou um grande potencial antagônico e que provavelmente seja um biocontrolador no sistema agroflorestal de onde ele foi isolado.

### 3.3. Endofíticos e controle biológico

Aumentou significativamente nos últimos anos o interesse no emprego de microrganismos em práticas agrícolas, pois tanto no crescimento vegetal como no controle biológico de pragas e doenças de plantas, eles se constituem em potenciais substitutos de produtos químicos (Souza, 2001; Peixoto Neto et al., 2002).

A produção de certos compostos como antibióticos e outros metabólicos, por micro-organismos endofíticos, já sugeria que eles podem controlar doenças de plantas. Aproximadamente 80% desses fungos produzem compostos bioativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas, pois a penetração ativa do microrganismo induz a planta hospedeira a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno, alterando a morfofisiologia vegetal (Schulz et al., 2005).

Dentro desse contexto, os microrganismos apresentam importante propriedade de conferir proteção às plantas, seja pela sua presença nas plantas hospedeiras, seja pela aplicação como agentes de biocontrole, que podem resultar na eliminação de pragas agrícolas (Souza, 2001).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### **Local dos ensaios**

Os ensaios serão realizados no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM.

##### **Obtenção dos isolados de fungos**

Os isolados dos fungos foram obtidos a partir de plantas de guaranazeiro sem sintomas de antracnose, em áreas de cultivo no município de Maués - AM e na área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental- CPAA-AM.

Foram coletadas amostras de folhas, ramos, flores, frutos e da rizosfera das plantas, acondicionadas em sacos de papel e transportadas para o laboratório onde foi feito o isolamento indireto dos fungos. As amostras foram lavadas com sabão em água corrente, desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 1,5% (produto comercial com 2%) por quatro minutos, lavadas em água destilada esterilizada e colocadas para secar em papel de filtro esterilizado. Após desinfestação, foram retirados discos foliares (5 mm diâmetro) e fragmentos do caule e raiz (5 mm comprimento), transferidos para placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com o antibiótico cloranfenicol ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ) e incubados à temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Silva et. al, 2006). Os isolados obtidos foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado, em incubadora BOD a  $27^\circ\text{C}$ , até a realização dos demais ensaios.

O isolamento do *C. guaranicola* foi feito de forma indireta de acordo com Alfenas e Maffia (2007), usando folhas de guraranazeiro com sintomas típicos da doença, coletados nas mesmas localidades citadas acima. Foram retirados fragmentos de folhas da área de transição entre a parte sadia e a lesionada, submetidas a uma desinfestação superficial em álcool a 70% por 30 segundos; hipoclorito de sódio a 1,5 %



por 30 segundos e lavados em água destilada por 3 vezes consecutivas. Foram depositados 5 fragmentos em cada placa de petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). As placas foram incubadas sob temperatura de 28° C durante 48 horas. Posteriormente foram repicados para novas placas, para individualização das colônias.

#### **Screening de isolados com atividade inibidora.**

Foi realizada uma seleção massal dos isolados obtidos visando identificar aqueles com potencial de inibição do crescimento micelial *de C. guaranicola in vitro*. Foram utilizadas placas de Petri de 100 x 15mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA onde foram depositados em pontos equidistantes, quatro discos de meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro, contendo a colônia dos fungos endofíticos previamente isolados. No centro de cada placa foi depositado um disco de meio de cultura de conteúdo a colônia do fitopatógeno. As placas foram incubadas em BOD sem fotoperíodo, a 27 °C por sete dias. A avaliação foi feita por meio da medição do halo de inibição formado entre a colônia do fitopatógeno e o potencial inibidor, usando uma régua.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições, sendo cada unidade experimental uma placa de Petri. Os valores de halo de inibição foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, usando programa SAEG 9.0.

Os isolados que apresentaram melhor resultado neste ensaio serão avaliados pela técnica de pareamento de colônias.

**Avaliação do potencial dos isolados na inibição do crescimento micelial e na produção de conídios de *C. guaranicola*.**

O antagonismo dos isolados será avaliado pelo método da cultura pareada que consiste no confronto direto do antagonista e do fungo patogênico em placas de Petri contendo meio de cultura sólido. Os fungos serão crescidos em placas de Petri com meio BDA a 28<sup>o</sup> C. Discos de ágar de 5 mm de diâmetro serão removidos das bordas das colônias em crescimento e um disco de meio de cultura do inibidor e outro do patógeno serão transferidos para placas de Petri contendo meio sólido dispostos em polos opostos equidistantes a 1 cm da borda interna da placa. A avaliação será feita pela presença de halo de inibição do crescimento micelial do fungo patogênico em relação ao inibidor, e pela medição do diâmetro das colônias de ambos os fungos, que será usado para calcular o índice de crescimento micelial (ICM) dos isolados conforme a fórmula descrita por Peres et al. (2003):

$$ICM = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \dots + \frac{C_N}{N_N}$$

Onde:

ICM = índice de crescimento micelial

C<sub>1</sub> = crescimento micelial no primeiro dia

N<sub>1</sub> = número de dias

Os valores de ICM serão analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, usando programa SAEG 9.0.

A produção de conídios do *C. guaranicola* na presença do antagonista será avaliada, através do método de contagem em gota. Após o término das avaliações de crescimento, será preparada uma suspensão de esporos adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada nas placas, somente sobre a colônia do patógeno e com o auxílio de um pincel de cerdas macias, serão removidos os conídios dos conidióforos. A solução será recolhida em um béquer, no qual foram adicionados 10 µL de solução de

Tween 80. Serão recolhidas três alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão e depositadas em lâmina para microscopia, para a quantificação dos esporos total em cada alíquota. Por regra de três será calculado o número de conídios. $\text{mL}^{-1}$  de cada tratamento.

O delineamento experimental será inteiramente ao caso com cinco repetições, sendo cada unidade experimental uma placa de Petri. Como controles serão utilizadas placas contendo discos de cultura somente do inibidor e apenas do patógeno.

Os dados obtidos a partir da quantificação de conídios serão analisados estatisticamente conforme descrito acima.

## 5. RESULTADO

<b>Fungos isolados do guaranazeiro</b>		
<b>Código</b>	<b>Gênero</b>	<b>Procedência</b>
AG01	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG02	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG03	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG04	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG05	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG06	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG07	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG08	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG09	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG10	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG11	<i>Colletotrichum</i>	300 Maués
AG12	<i>Colletotrichum</i>	300 Maués
AG13	<i>Colletotrichum</i>	300 Maués
AG14	<i>Colletotrichum + Fusarium</i>	300 Maués
AG15	<i>Fusarium</i>	300 Maués
AG16	<i>Guinardia</i>	300 Maués
AG17	<i>Guinardia</i>	300 Maués
AG19	<i>Penicilium</i>	300 Maués
AG20	<i>Penicilium</i>	300 Maués
AG21	<i>Penicilium</i>	300 Maués
AG22	<i>Penicilium</i>	300 Maués
AG23	<i>Paecilomyces</i>	300 Maués
AG24	<i>Curvularia</i>	300 Maués
AG25	<i>Curvularia</i>	300 Maués
AG26	<i>Nigrospora</i>	871 Maués
AG27	<i>Guinardia</i>	300 Mao
AG28	<i>Guinardia</i>	300 Mao
AG29	<i>Guinardia</i>	300 Mao
AG30	<i>Giumaniela</i>	300 Mao
AG31	<i>Nigrospora</i>	300 Mao
AG32	<i>Colletotrichum</i>	300 Mao
AG33	<i>Fusarium</i>	300 Mao

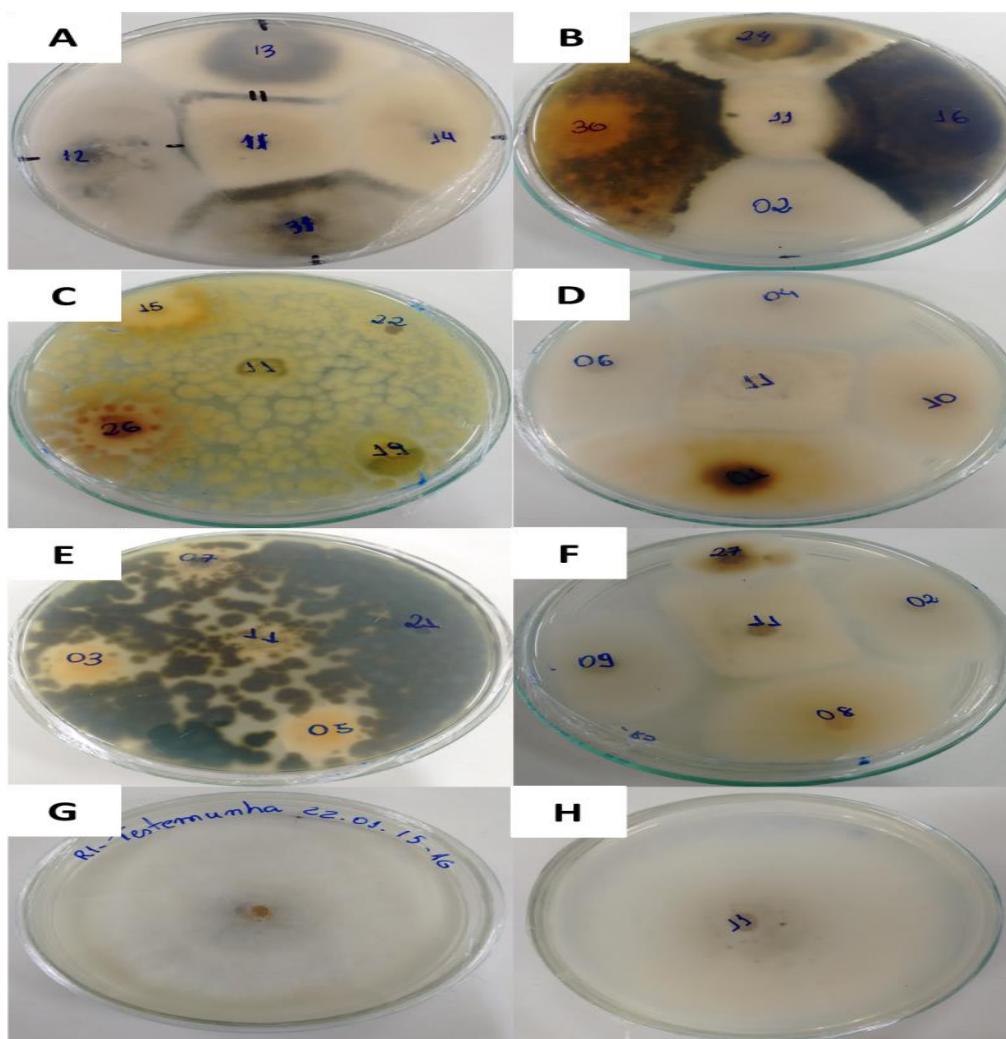
Tabela1. Fungos endofíticos isolados de plantas de guaraná, usados na seleção de inibidores de crescimento de *Colletotrichum guaranicola*.

### **Resultado Final**

#### **Screening de isolados com atividade inibidora.**

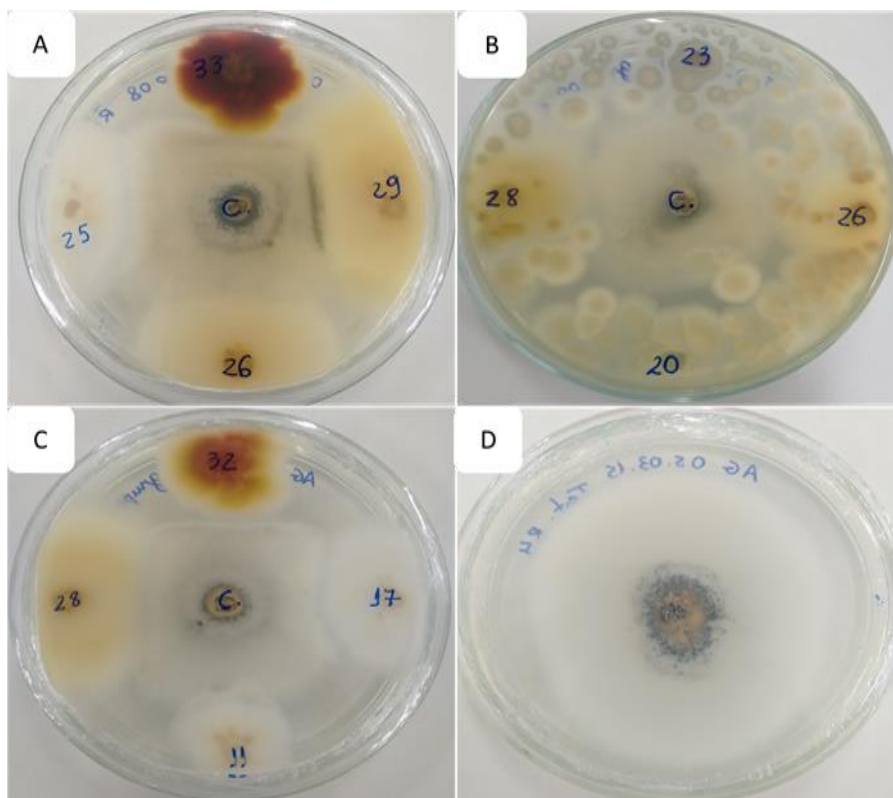
Foram testados 23 dos 32 isolados obtidos, pois os demais isolados foram contaminados por bactéria. Os isolados contaminados serão recuperados e testados no decorrer da pesquisa. Não houve a formação do halo de inibição entre a colônia do fitopatógeno (isolado 11) e os endofíticos testados (Figuras 1).

O endofítico *Penicilium* foi o que apresentou potencial inibidor por ter colonizado totalmente a placa e inibiu o crescimento dos demais fungos inclusive o fitopatógenos (Figura 1 – C e E).



**Figura 1** – Screening de fungos endofíticos com potencial de inibição do crescimento micelial de *C. guaranicola*. **A** – Não ocorreu inibição no teste com os isolados 13,12,14 e 31; **B** – Não ocorreu inibição no teste com os isolados 24,30,16 e 02; **C** – O isolado 22 inibiu o crescimento micelial do *C. guaranicola* e dos demais isolados 15, 26 e 19; **D** – Não ocorreu inibição no teste com os isolados 04, 10, 01 e 06; **E** – O isolado 21 inibiu o crescimento do *C. guaranicola* e dos demais isolados 03, 07 e 05; **F** – Não ocorreu inibição no teste com os isolados 02, 08, 09 e 27; **G** e **F** – Testemunha *C.guaranicola*.

Os isolados contaminados por bactéria foram recuperados, e não houve a formação do halo de inibição entre a colônia do fitopatógeno (C.) e os endofíticos testados no *screening* realizado (figura 2).

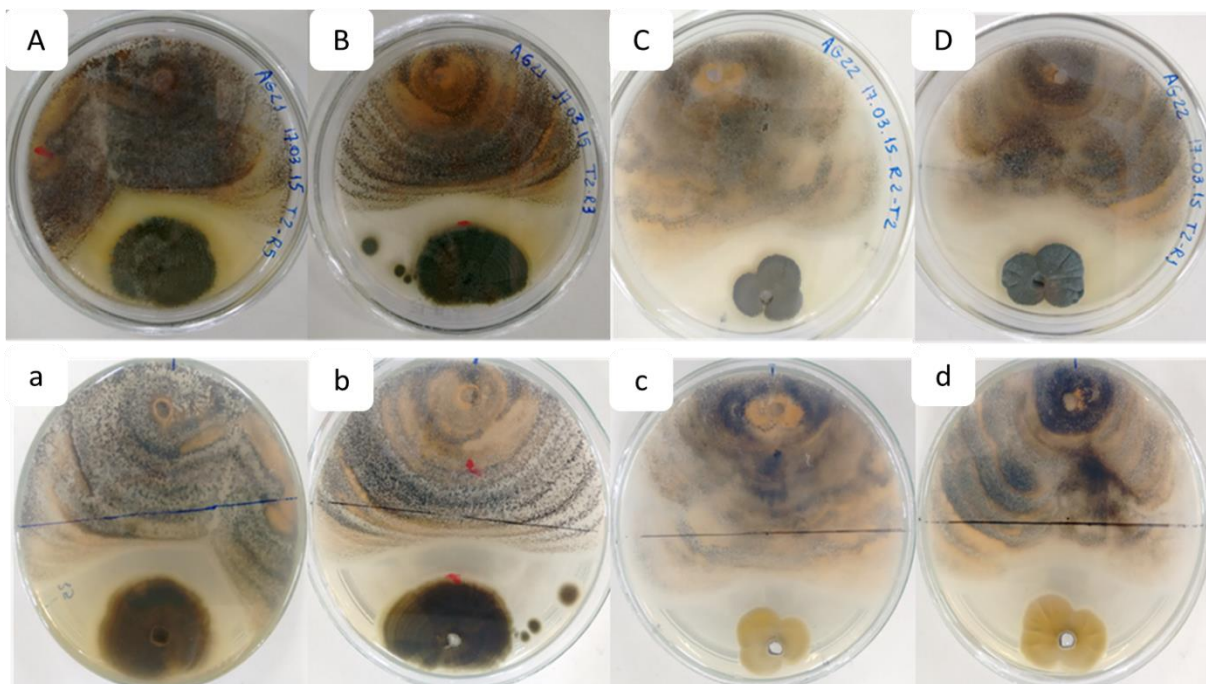


**Figura 2** – *Screening* de fungos endofíticos com potencial de inibição do crescimento micelial de *C. guaranicola*. A – Não ocorreu inibição no teste com os isolados 33, 29, 26 e 25; B – Não ocorreu inibição no teste com os isolados 23, 26, 20 e 28; C – Não ocorreu inibição no teste com os isolados 32, 17, 11 e 28; e D – Testemunha *C. guaranicola*.

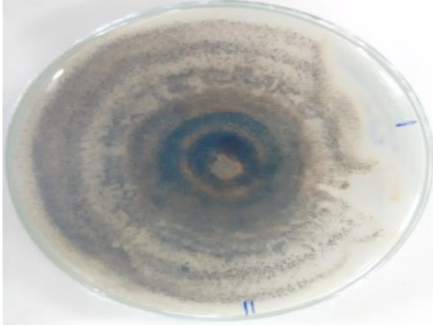
Os isolados endofíticos que apresentaram maior potencial de inibição ficaram 20 dias em processo de fermentação em meio BD, e após esse período, esses isolados fermentados foram filtrados em membrana milipore (0,22  $\mu\text{m}$  – diâmetro de 33 mm) visando avaliar a presença de metabólitos secundários inibidores.

**Avaliação do potencial dos isolados na inibição do crescimento micelial e na produção de conídios de *C. guaranicola*.**

O antagonismo dos isolados foi avaliado pelo método da cultura pareada. Foram testados os isolados endofíticos que apresentaram inibição durante o *screening*, como os isolados AG21 E AG22 que apresentaram halo de inibição. Os poços foram preenchidos com 30  $\mu$ l do extrato inibidor. (figura 3).



**Figura 3** – Avaliação do potencial dos isolados na inibição do crescimento micelial de *C. guaranicola*. **A** – Pareamento direto do isolado AG 21 (R5) e do *C. guaranicola*. **a** – verso da placa; **B** – Pareamento direto do isolado AG 21 (R3) e do *C.guaranicola*. **b** – verso da placa; **C** – Pareamento direto do isolado AG 22 (R2) e do *C.guaranicola*. **c** – verso da placa e **D** - Pareamento direto do isolado AG 22 (R1) e do *C.guaranicola*. **d** – verso da placa.



**Figura 4** – Testemunha *C. guaranicola*.

## 6. CONCLUSÃO

Constatou-se que os isolados endofíticos A21 e AG22, mostram-se como possíveis estratégias para o controle de *C. guaranicola*, já que apresentaram halo de inibição do crescimento deste fitopatógeno durante o teste de cultura pareada, sendo estes microrganismos importantes por apresentarem propriedade para conferir proteção às plantas. É necessário ampliar o número de isolados de fungos endofíticos para posteriores estudos.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 th ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 382p.

AULER, A.C.V.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@mbiente** On-line, v. 7, n. 3, p. 359-365, setembro-dezembro, 2013.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna, SP.: Embrapa Meio Ambiente, 2002, 78p.

INFANTE, D.; MARTINEZ, B; GONZALEZ, N.; REYES, Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopágenos. **Rev. Protección Veg.** 2009, vol.24, n.1, pp. 14-21.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PERES, A.P.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. Lavras: **Ciências Agrotécnicas**, v.27, n.5, p.1053-1062, 2003.

SILVA, R.L.O; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção de crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta. Bot. Bras.** Vol 20. n<sup>o</sup> 3, 2006. 649-655.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, jun. de 2005.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biociencia**, Piracicaba, n. 21, p. 28-31, 2001.

WAICHMAN, A.V.; RIBEIRO, R.J.; NINA, N.C.S. Use and fate of pesticides in the Amazon State, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**. V. 9 (6), p.423-428. 2002.

