

METODOLOGIA DE CONTROLE BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADAS DAS SEMENTES DE CACAU (*THEOBROMA CACAO* L.) COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Eliane da Silva da Cruz¹, Ana Cibelle Tavares Leal², Brenda Silva de Lima³, Raquel Soares Casaes Nunes⁴

¹ Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), Belém, Pará, Brasil, elianecruz119@gmail.com

² Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), Belém, Pará, Brasil, cibelleleal.ufra@gmail.com

³ Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), Belém, Pará, Brasil, brendz93@gmail.com

⁴ Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), Belém, Pará, Brasil, raquel.nunes@ufra.edu.br

Palavras-chave: biocontrole, metodologia, fungos endofíticos

INTRODUÇÃO

A incidência de fitopatógenos causadores de doenças durante o desenvolvimento de plantas ocasiona problemas relacionados à pós-colheita e são fatores que limitam o desenvolvimento do mercado de várias culturas na Amazônia [1], além disso, o uso indiscriminado de diversos agrotóxicos, visando a prática de uma agricultura econômica, em longo prazo produz resultados negativos, com grandes prejuízos para a sociedade e meio ambiente, principalmente pela capacidade de causar poluição e desequilíbrio aos ecossistemas naturais[2].

Assim, com o acúmulo de informações sobre a interação planta e microrganismos endofíticos, tem sido enfatizado o estudo de fungos endofíticos que possuem potencial para atuar no controle biológico de inúmeras pragas e doenças [3].

Neste sentido, o estudo fomenta discussões sobre a importância da padronização de metodologia para biocontrole com a utilização dos fungos com potencial endofítico (*Cladosporidium cladosporoides*, *Galactomyces geotrichum*, *ascomicota sp.*) para utilização como alternativa promissora aos tratamentos convencionais de controle de pragas nas plantações, visando analisar e caracterizar diversas aplicações entre si na solução de bactérias que atacam o cacau (*Theobroma cacao* L.) na região amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo é uma abordagem investigativa e experimental, com informações obtidas de isolados conduzidos no laboratório de microbiologia e biologia molecular da Universidade Federal Rural da Amazônia UFRA e Laboratório de Proteção das Plantas na UFRA. Neste também, foram obtidas a coleção de isolados das espécies de bactérias e fungos.

A elaboração dos meios de cultivo foi feita no laboratório de microbiologia e biologia molecular no ano de 2022 por sete dias. Isto posto, as células dos isolados testados, foram plaqueadas nas placas de Petri descartáveis de 8 ml, 25ml e 50ml. Para os fungos, o meio de

cultivo utilizado foi Sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar-SDA) juntamente com água destilada, e para as bactérias, o meio de cultivo utilizado foi Mueller-Hinton Agar(MHA)juntamente com água destilada(AD);

Desta maneira, com o auxílio de alças estéreis descartáveis foram incubadas na estufa BOD, a 30°C por 72 horas os isolados bacterianos e os isolados fúngicos, ambos com fotoperíodo de 12h de luz / 12h de escuro. Assim, após 72h de ativação, os isolados bacterianos foram submetidos à identificação da coloração Gram.

Assim, após o período de incubação os isolados retirados com o auxílio de alças bacteriológicas estéreis descartáveis e acrescidos em conjunto, espaçados entre si em 40 mm, seguindo em lados opostos de placas de Petri descartáveis sobre meio de cultivo. Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C na estufa BOD por 72 horas, com fotoperíodo de 12h de luz / 12h de escuro.

Além disso, as interações competitivas foram analisadas segundo a escala de Badalyan et al. [4] e o crescimento dos isolados foram medidos utilizando a média em centímetros entre as duas distâncias entre o fungos e as bactérias.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram utilizados três isolados fúngicos *Galactomyces geotrichum* (código da placa nº 110C3), *Geotrichum candidum* (código da placa nº 176C5) e *ascomycota spp.* (código da placa nº 112C2) com dois isolados bacterianos *Enterobacter hormaechei* (código da placa nº 249.3), *Bacillus thuringiensis* (código da placa nº 251.4). Nesse sentido, foram inoculados em uma placa de Petri, um isolado de fungo no centro com um isolado bacteriano nas laterais, conforme a tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Tabela com a ordem de inibição dos isolados fúngicos com os isolados bacterianos em uma placa

IB	IF	IB
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Galactomyces geotrichum</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>ascomycota spp</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>

Legenda: Isolado Bacteriano (IB) e Isolado fungico (IF).

Com relação aos tipos de interações, os isolados não apresentaram interação do tipo A (“deadlock”, com contato micelial), dois apresentaram interações do tipo B (“deadlock”, a

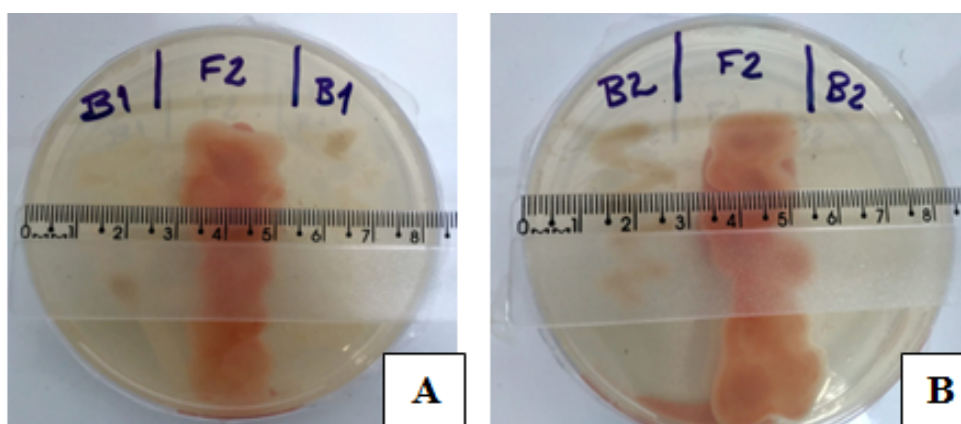
distância) e 1 isolado apresentou interação tipo CA1 (crescimento parcial do endofítico sobre a bactéria após “deadlock” inicial com contato) de acordo com a escala de Badalyan et al. [4]. Esses resultados demonstram que o fungo endofítico *Galactomyces geotrichum* foi o que apresentou maior potencial para futuros estudos no controle biológico, com maiores índices de crescimentos e inibições, conforme a tabela 2 e figura 01, abaixo.

Tabela 2: Teste de antagonismo das linhagens endofíticas isoladas de *Geotrichum candidum*, *Galactomyces geotrichum*, *Ascomycota spp* contra a bactéria *Enterobacter hormaechei* e *Bacillus thuringiensis*.

LF	LB	MICB (cm)	Tipo de interação
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> .	1,35	B
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	0,75	B
<i>Galactomyces geotrichum</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> .	0,55	Ca1
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	0,70	Ca1
<i>Ascomycota spp</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> .	1,6	B
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1,35	B

Legenda: LF-Linhagem fungica, LB-Linhagem bacteriana, MICB- Medição da inibição do crescimento bacteriano (cm).

Figura 1: Teste de antagonismo: à esquerda (A) isolado fúngico *Galactomyces geotrichum* contra a bactéria *Bacillus thuringiensis*; à direita (B) isolado fúngico *Galactomyces geotrichum* contra a bactéria *Enterobacter hormaechei*



Legenda: B1- *Bacillus thuringiensis*, B2- *Enterobacter hormaechei*, F2- *Galactomyces geotrichum*

CONCLUSÃO

As análises observadas a partir da metodologia aplicada revelaram que alguns isolados ao entrar em contato com as bactérias tiveram interações interespecíficas harmônicas, porém, apesar conseguirem sobreviver no mesmo ambiente que o fungo endofítico, a bactéria não conseguiu aumentar a sua colônia, desta forma, houve um controle de crescimento, promovido pelo fungo endofítico aplicado, entretanto, pode-se verificar que esta inibição

apresentou diferentes porcentagens (Tabela 2), porém o fungo endofítico *Galactomyces geotrichum* foi o que apresentou maior índice de inibição (Figura 1).

Desta forma, observou-se que no caso das amostras analisadas, o desenvolvimento de uma metodologia para o desenvolvimento de pesquisas foi fundamental para fomentar discussões mais seguras e aplicar um maior controle dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais para a Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), por proporcionar oportunidades para execução deste artigo.

REFERÊNCIAS

- [1] RIBEIRO, J. G.; SERRA, I. M. R. D. S.; ARAÚJO, M. U. P. Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 2, p. 160-164, 2016.
- [2] ALMEIDA, A.F; BENTES, J.L.S.; HIDALGO, A.F. **Atividade antifúngica de *Picrolemma sprucei* Hook sobre o crescimento de fitopatógenos.** Diversidade microbiana da Amazônia, Manaus, ano 2016, v. 2, p. 348, 2017. Disponível em: https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/4679/1/diversidade_microbiana_Vol2.pdf. Acesso em: 2 jun. 2022.
- [3] ASSUMPÇÃO, L. D. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L. D.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Piracicaba, v. 44, p.503-510, 2009.
- [4] BADALYAN, S. M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathol Mediterr.** v. 41, p. 200-225, 2002.