

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

IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS DO
GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) COM
ATIVIDADE ANTAGONICA AO FITOPATÓGENO *Colletotrichum*
guaranicola

Bolsista: Bruna Munithely Villalba, FAPEAM
Orientador: Prof. MSc. Ítalo Thiago Silveira Rocha Matos

MANAUS

2012

Todos os direitos deste relatório são reservados a Universidade Federal do Amazonas, ao núcleo de Biotecnologia Molecular 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 Bolsa de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa de Biotecnologia Molecular e se caracteriza como um subprojeto do projeto de pesquisa “Microrganismos Associados ao Guaranazeiro com Potencial Biotecnológico e Agrícola: Especialmente Visando o Controle da Antracnose”.

Resumo

O plantio do Guaranazeiro vem sendo assolado por diversas pragas, dentre as quais se destaca a antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* (Araújo et al., 2007). As plantas podem se associar com microorganismo de modo harmônico ou desarmônico, sendo que estas associações têm sido amplamente estudadas. As leveduras são integrantes do reino Fungi, predominantemente unicelulares e de reprodução assexuada, seu potencial antagônico tem sido vastamente estudado, com alguns resultados promissores. Portanto é razoável pensar que as leveduras possuem um potencial antagônico, em virtude dos diversos trabalhos publicados. Os explantes de guaranazeiro foram coletado na fazenda experimental da UFAM, sendo que foram coletadas tanto de plantas saudáveis e acometidas pela Antracnose fragmentos de folhas de guaranazeiro e a seguir, 100µL foram espalhados em placas contendo Agar Sabouraud, após o crescimento foi realizado o teste de antagonismo com as leveduras isoladas da planta, conforme metodologia descrita por Pacioni et al. (2007), com as leveduras foram cultivadas, juntamente com um fragmento micelial de *Colletotrichum guaranicola*, em placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose (pH 7,0). Os testes foram realizados em triplicata, destas foram isolados 51 colônias de vários microorganismos, dentre estas apenas 20 linhagens apresentaram resultado positivo para o teste de antagonismo contra o *C. guaranicola*, destas 2 apenas apresentaram halo de inibição, visto que as outras obtiveram antagonismo através do contato. As que apresentaram halo de inibição, tiveram o seu perfil bioquímico verificado usando o Kit ID 32C da bioMérieux, a linhagem IB14 96,4% de identidade *Candida guilliermondii* com 96,4% de identidade, e a linhagem IB30 84% de identidade *Candida guilliermondii* com 84% de identidade. Contudo é notável a capacidade das leveduras de realizarem antagonismo, seja formando halos ou por contato.

Antagonismo. *Colletotrichum guaranicola*. Levedura. Guaranazeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ilustração do teste de antagonismo.....	9
Figura 2: Teste de Antagonismo com a linhagem B17 e C. guaranicola.....	18
Figura 3: Teste de Antagonismo com a linhagem B40 e o C. guaranicola.	18
Figura 4: Teste de Antagonismo com a linhagem B14 e o C. gurananicola....	19
Figura5: Teste de Antagonismo com a linhagem B09 e o C. guaranicola.....	19
Figura 6: Teste de Antagonismo com a linhagem B30 e o C. guaranicola.	20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- TESTE DE ANTAGONISMO.....	11
TABELA 2 - PERFIL BIOQUÍMICO DA LINHAGEM B14.....	12
TABELA 3 -PERFIL BIOQUÍMICO DA LINHAGEM B17.....	12
TABELA 4 -PERFIL BIOQUÍMICO DA LINHAGEM B30.....	13

Sumário

1 - Introdução.....	07
2 - Metodologia.....	09
3 - Resultados e discussão	11
4. Conclusão	15
5.Referencias.....	16
6.Anexo de imagens.....	18

1. Introdução

O guaranazeiro (*Paullina cupana* var. *sorbilis* (Martius) Duke) apresenta grande importância econômica e alimentar para o Brasil, especialmente para a região Amazônica, seu centro de origem. O Brasil é o único produtor mundial de guaraná em escala comercial. Mais de 15.300 ha estão plantados em diferentes estados do país, dos quais 8.029 ha situam-se no estado do Amazonas (Nascimento Filho e Atroch, 2002; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2006).

Mesmo com alguns estudos já realizados, o plantio do guaraná ainda é assolado por diversas pragas, as quais levaram a uma queda da produção na região Norte durante a década de 90 (Bente e Barreto, 2004; Mileo ET.al. 2006; Gonçalves et.al., 2006). Entre estas, a mais importante é a antracnose, causada pelo fungo *Coletotrichum guaranicola* (Araújo et al., 2007).

As plantas podem ser atacadas em todos os seus estágios de desenvolvimento, com os seguintes sintomas: lesões necróticas nas folhas, partes necrosadas com uma coloração marron-avermelhada, os folíolos à medida que crescem tornam-se quebradiços.

A associação entre microrganismos e plantas pode ocorrer de forma harmônica ou desarmônica, sendo que as pesquisas com foco em microrganismos endofíticos tem crescido vertiginosamente na última década. Estima-se que entre 1971 e 1990 foram publicados em média 1,2 artigos completos por ano com esta temática, enquanto que entre 2000 e 2007 foram produzidos mais de 15 artigos por ano. Diversos trabalhos associam microrganismos endofíticos à produção e transformação de metabólitos vegetais, quer do metabolismo primário, quer do secundário (Rodríguez et al., 2010).

Leveduras são microrganismos integrantes do reino Fungi, predominantemente unicelulares e com reprodução assexuada por brotamento, pertencente aos filos Basidiomycota e Ascomycota, e com alguns exemplares no filo Deuteromycota (Alexopoulos et al., 1996).

O potencial antagônico de leveduras contra fitopatógenos tem sido amplamente estudado, com alguns resultados promissores. Qin et al. (2004) isolaram leveduras endofíticas de cerejeira, as quais foram eficazes em inibir *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, que provocam o apodrecimento do fruto na fase pós-colheita. Abraham et al. (2010) isolaram 10 linhagens de leveduras capazes de inibir o crescimento de *Penicillium digitatum*, patógeno de *Citrus* sp., reduzindo a superfície de crescimento deste em taxa superior ou igual a 50%.

As leveduras são, portanto, componentes importantes da microbiota endofítica do guaranazeiro. No entanto, o potencial antagonista destas contra patógenos do guaranazeiro segue não elucidado.

2. Metodologia

Os explantes de guaranazeiro foram coletados em áreas de plantio na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas. (2° 39'03.74" S, 60° 03'19.23" O).

Fragmentos de folhas de guaranazeiro foram macerados em cadinhos de cerâmica contendo 1,0mL de solução de Poli-Vinil Pirrolodona (PVP, 10%) e 1,0 mL de tampão PBS, conforme metodologia descrita por Pereira et al. (1993). A seguir, 100µL foram cultivados por espalhamento com alça de Drigalski em placas contendo Agar Sabouraud. As placas foram incubadas a 30 °C por até 5 dias, avaliando-as a cada 24 horas. Para a obtenção de culturas puras, colônias típicas de leveduras foram repicadas para placas contendo Agar Sabouraud.

A atividade antagônica foi avaliada conforme metodologia descrita por Pacioni et al. (2007). As leveduras foram cultivadas, juntamente com um fragmento micelial de *Colletotrichum guaranicola*, em placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose (pH 7,0). As placas foram incubadas a 30 °C por até 20 dias, observando diariamente para detecção de halos de inibição, evidenciando antagonismo, conforme esquematizado na figura 1.

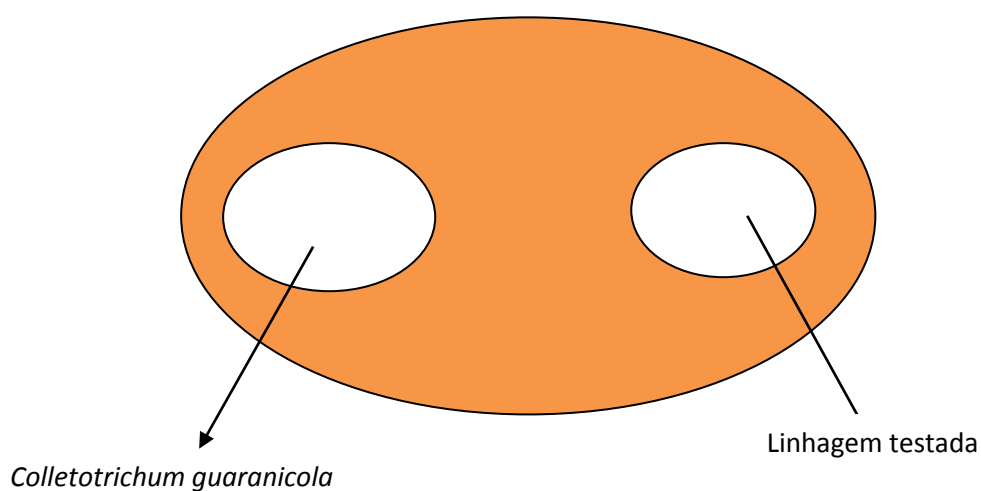


Figura 01: Ilustração do teste de antagonismo

A identificação taxonômica foi feita por meio de provas bioquímicas, usando o kit ID 32C da bioMérieux, plotando os dados no aplicativo Apiweb (Biomerieux). Após identificadas, as colônias foram preservadas por meio das técnicas de Castellani e em Glicerol a 25%, conforme descrito por Rodrigues et al. (1992).

3. Resultados e discussão

Foram isoladas 51 colônias, das quais 20 foram reconhecidas ao microscópio óptico como leveduras. Destas, 5 linhagens apresentaram resultado positivo para o teste de antagonismo contra o *C. guaranicola*, conforme tabela 1.

Tabela 1: Teste de antagonismo

Linhagem testada	Teste de Antagonismo	Observação	Diâmetro do Halo
B01	-		
B03	-		
B04	-		
B09	+	Inibição por contato	
B12	-		
B14	+	Formação de halo	16 mm
B15	-		
B16	-		
B17	+	Inibição por contato	
B20	-		
B28	-		
B29	-		
B30	+	Formação de halo	24 mm
B31	-		
B32	-		
B35	-		
B38	-		
B39	-		
B40	+	Inibição por contato	
B50	-		

Legendas: (+) Resultado positivo (inibição do crescimento de *C. guaranicola*);
(-) Resultado negativo.

Entre as linhagens que apresentaram atividade antagônica, três tiveram perfil bioquímico verificado.

A levedura B14 possui perfil bioquímico correspondente a *Candida guilliermondii*, com 96,4% de identidade, conforme a tabela 2.

Tabela 2: Perfil Bioquímico da linhagem B14

Substrato	Resultado	Substrato	Resultado
D-galactose	+	D-xilose	+
Cycloheximida	+	D-ribose	-
D-sacrose	+	Glicerol	+
N-Acetil Glucosamina	+	L-ramnose	-
Ácido Láctico	-	PaLatinosE	+
L-arabinose	+	Eritritol	-
D-celobiose	+	D-melibiose	-
D-rafinose	+	Glucuronato de sódio	-
D-maltose	+	D-melezitose	+
D-threalose	+	Gluconato de potássio	-
2-cetogulconato de poássio	+	Ácido levulinico	-
α -metil D-Glucopiranosida	+	D-GLUcose	+
D-MANitol	+	L-SorBosE	-
D-LACtose	-	GlucosamiNa	+
INOsitol	-	ESCulina citrate de ferro	+
D-SORbitol	+	Controle negativo	-

Legenda: (+) Assimilação positiva; (-) Assimilação negativa.

A levedura B17, segundo o aplicativo Apiweb, possui perfil bioquímico incaceitável. É provável tratar-se de espécie ainda não descrita ou ainda não incluída nos bancos de dados da Biomerieux.

Tabela 3: Perfil Bioquímico da linhagem B17

Substrato	Resultado	Substrato	Resultado
D-galactose	+	D-xilose	+
Cycloheximida	+	D-ribose	-
D-sacrose	+	Glicerol	+
N-Acetil Glucosamina	+	L-ramnose	+
Ácido Láctico	+	Palatinose	+

L-Arabinose	+	Eritritol	—
D-celobiose	+	D-melibiose	+
D-rafinose	+	Glucuronato de sódio	+
D-maltose	+	D-melezitose	+
D-threalose	+	Gluconato de potássio	+
2-cetoGulconato de potássio	-	Ácido levulinico	—
α -metil D-Glucopiranosida	-	D-glucose	+
D-manitol	+	L-SorBosE	-
D-lactose	+	Glucosamina	+
Inositol	+	Esculina citrato de ferro	+
D-sorbitol	-	Controle negativo	—

Legenda: (+) Assimilação positiva; (-) Assimilação negativa.

A levedura B30 possui perfil bioquímico correspondente a *Candida guilliermondii*, com 84% de identidade, conforme tabela 4.

Tabela 4: Perfil Bioquímico da linhagem B30.

Substrato	Resultado	Substrato	Resultado
D-galactose	+	D-xilose	+
Cycloheximida	+	D-ribose	+
D-sacrose	+	Glicerol	+
N-Acetil Glucosamina	+	L-ramnose	—
Ácido lactic	-	Palatinose	+
L-arabinose	+	Eritritol	—
D-celobiose	+	D-melibiose	—
D-rafinose	+	Glucuronato de sódio	-
D-maltose	+	D-melezitose	+
D-threalose	+	Gluconato de potássio	-
2-cetoGulconato de potássio	+	Ácido LeVulinico	—
α -metil D-Glucopiranosida	+	D-glucose	+

D-manitol	+	L-sorbose	+
D-lactose	–	Glucosamina	+
Inositol	–	Esculina citrato de ferro	+
D-sorbitol	+	Controle negativo	–

Legenda: (+) Assimilação positiva; (-) Assimilação negativa.

Visto que apenas as leveduras B14 e B30 apresentaram halo de inibição, somente com esta foram feitas as técnicas de extração de DNA. Por razões de ordem técnica, a identificação através do sequenciamento das regiões ITS 1 e 4 do DNA genômico não foi efetuada até o presente momento, restando-nos a apresentação somente dos resultados de identificação através do kit ID 32 C da bioMérieux.

4. Conclusões

E razoável dizer que as leveduras endofíticas do guaranazeiro possuem um potencial antagônico com relação ao patógeno *Colletotrichum guaranicola*, entretanto apenas duas linhagens foram capazes que gerar halos de inibição.

Recomenda-se o uso de leveduras endofíticas para seu uso como inibidores do crescimento deste patógeno no guaranazeiro, e produção de biofungicida para esta doença. Entretanto novos estudos devem ser realizados no intuito de estabelecer as condições ideais para obtenção deste bioproduto.

5. Referências bibliográficas

ABRAHAM, A.O.; M.D.; BOWER, J.P. Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *digitatum* of citrus fruit. **Biological Control**. 53: 32-38.2010.

ALEXOPOULOS, C. .; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. 4° ed. John Wiley e Sons, New York: 1996.

ARAUJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J. KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Calq, 2002b. 86 p.

ARAUJO, J.C.A.; PERREIRA, J.C.R.; GASPAROTO, L.; ARRUDA, M.R.; MOREIRA, A. Antracnose do guaranazeiro e seu controle. **Comunicado Técnico- Embrapa**. Manaus: 2007.

ARNOLD, A.E Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**.21: 51-66.2007.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2ª ed. Cambridge University Press. Cambridge. 1990.

BENTS, J.L.S E BARRETO, R.W.Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. Agente causal da antracnose do guaranazeiro. **Acta Amazonica**, v.34, n.1, p. 129-131, 2004.

GONÇALVES, J.F.C.; SANTOS JUNIOR, U.M.; SILVA, J.F.;BONATES, L.C.M.; FERNANDES, A.V. Physiological and anatomical characteristics of leaves of two clones of guarana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.393-398, 2006.

HANADA, R.E.; POMELLA, A W.V.; COSTA, H.S.; BEZERRA, J.L.; LOGUERCIO, L.L.; PEREIRA, J.O. Endophytic fungal Diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, 114, 901-910.2010.

HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; PETERSON K. R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. **BMC Biotechnol**. Nº 21, p. 4-8. 2004.

MILEO, L.J.; FEDOSYUK, H.; PETERSON K. R. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. **BMC Biotechnol**.Nº 21, p.4-8. 2004.

MIELO, J.L.; BENTES, J.L.S; SILVA, J.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Plantas de cobertura de solo como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola*. *Planta Daninha*, v. 24, n. 4, p.677-683, 2006.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L. Guaranazeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. UFV, Viçosa, Minas Gerais, p. 291-307. 2002.

PACIONI, G.; LEONARDI, M.; AIMOLA, P.; RAGNELLI, A.M.; RUBINI, A .; PAOLOCCI, F. Isolation and characterization of some mycelia inhabiting *Tuber ascomata*. **Mycological Research**. 111: 1450-1460. 2007.

PEREIRA, J.O., AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: A first report. **Mycologia**, v. 85, p. 362–364, 1993.

QIN, G.; TIAN, S.; XU, Y. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. **Postharvest Biology and Technology** 31: 51-58.2004.

RODRIGUES, E.G.; LIRIO, V.S.; LACAZ, C.S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse medico em água destilada. **Rev. Inst. Med. Trop.** 34(2): 159-165. 1992.

RODRÍGUEZ, P.; REYES, B.; BARTON, M.; CORONEL, C.; MENÉNDEZ, P.; GONZALEZ, D.; RODRÍGUEZ, S. Stereoselective biotransformation of α -alkyl- β -keto esters by endophytic and yeast. **Journal Catalysis B: Enzymatic**. Doi: 10.1016/j.molcatb.2011.04.003.2010.

6. Anexo de Imagens



Figura 2: Teste de Antagonismo com a linhagem B17 e *C. guaranicola*. Fonte: Bruna Munitelly

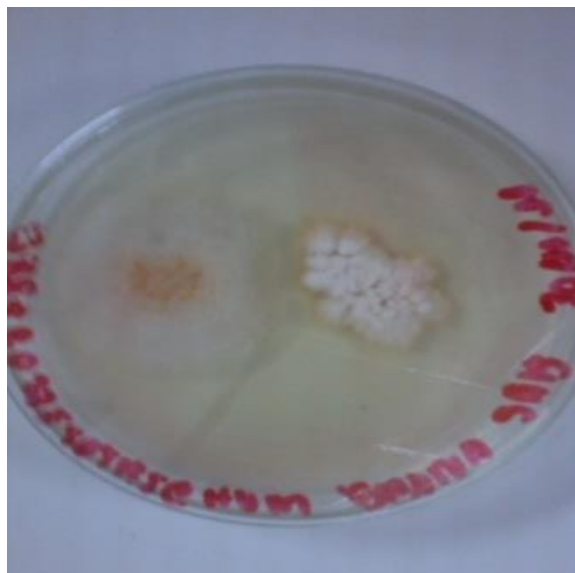


Figura 3: Teste de Antagonismo com a linhagem B40 e o *C. guaranicola*. Fonte Bruna Munitelly



Figura 4: Teste de Antagonismo com a linhagem B14 e o *C. guaranicola*. Fonte Bruna Munitely

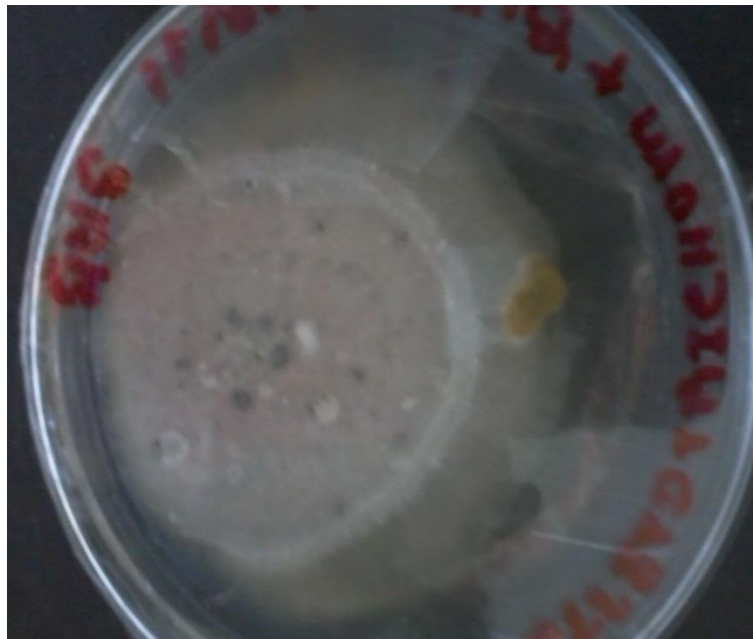


Figura5: Teste de Antagonismo com a linhagem B09 e o *C. guaranicola*. Fonte Bruna Munitely



Figura 6: Teste de Antagonismo com a linhagem B30 e o *C. guaranicola*. Fonte: Bruna Munitely