



CENTRO UNIVERSITÁRIO – CATÓLICA DE SANTA CATARINA

**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E
TECNOLÓGICA**

(X) PIBIC/PIBITI

vigência ago-2018/jul-2019

() PIBIC JR/PIBIC EM

vigência ago-2018/jul-2019

() UNIEDU

vigência mai-2019/abr-2020

**RAFAEL DUTRA DE ARMAS
BIOMEDICINA**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE
PATÓGENOS DA BANANA**

PROJETO DE PESQUISA DO PROFESSOR ORIENTADOR

PIBIC/PIBITI/UNIEDU

ÁREA ESTRATÉGICA DO PROJETO: BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

JOINVILLE, Julho de 2018.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Objetivo	2
3.	Método	2
4.	Cronograma	5
5.	Referências	7

Projeto de pesquisa (Plataforma Lattes)

--

1. INTRODUÇÃO

A região norte de Santa Catarina conta com mais de 10 mil agricultores familiares que cultivam banana, e devido à elevada incidência de doenças foliares aplicam uma alta dose de fungicidas para manter a produtividade da fruta. Há muito tempo já se sabe que esses fungicidas são agrotóxicos altamente prejudiciais à saúde, estão relacionados a casos de intoxicação e ao aparecimento de doenças, principalmente doenças neurológicas e o câncer, em humanos, além de causar impactos negativos sobre o ambiente. Por isso, esse projeto é de suma importância para o desenvolvimento de novas alternativas para substituir os agrotóxicos por controle biológico natural, benéfico à saúde e ao meio ambiente.

A banana (*Musa* spp.) é a fruta mais consumida no mundo devido a sua qualidade nutricional e também ao baixo custo (fao.org.br). Porém, alguns patógenos foliares comprometem a produtividade da banana, principalmente os causadores das doenças sigatoka negra e sigatoka amarela, provocadas pelos fungos *Mycosphaerella fijiensis* e *M. musicola*, respectivamente, que podem causar perdas de 20 a 80% na produtividade da banana (SILVA et al., 2014; CHURCHILL, 2011). O município de Luiz Alves-SC, faz parte desse projeto, é o segundo maior produtor de banana em Santa Catarina e faz parte de uma macrorregião produtora de banana, totalizando mais de 30 mil hectares e mais de 10 mil agricultores familiares envolvidos (cepa.epagri.sc.gov.br).

Devido à alta incidência de doenças, a produção de banana é ainda, em grande parte, dependente do uso excessivo de fungicidas. São realizadas de 9 a 12 aplicações por ano, principalmente dos grupos químicos Estrobilurina e Triazol, pertencentes a classe toxicológica II. Esses fungicidas são altamente prejudiciais à saúde e ao meio ambiente, mas principalmente aos agricultores que estão expostos durante e após a aplicação desses produtos. Além disso, o uso massivo de fungicidas pode causar desequilíbrio ecológico, redução da biodiversidade, contaminação de águas superficiais e até propiciar a seleção de patógenos resistentes, exigindo o aumento das doses e a frequência de aplicação desses

produtos (CORREIA et al., 2016; CHURCHILL, 2011; AMIL et al., 2007; MARÍN et al 2007).

Dentre as alternativas que têm sido praticadas aos agrotóxicos, destaca-se o controle biológico, que é definido como a utilização de organismos vivos que apresentem antagonismo ao patógeno estudado (PAL & GARDENE, 2006). Muitos estudos têm sido feitos em relação ao uso de microrganismos endofíticos como agentes de controle biológico de inúmeras doenças e pragas de plantas (PARK et al., 2017; AZEVEDO & ARAUJO, 2007). Porém, a bananicultura ainda é considerada uma produção secundária no que diz respeito às pesquisas para o desenvolvimento de produtos específicos, e por isso não há no mercado produtos biológicos para o controle de doenças foliares na banana.

2. OBJETIVO

Desenvolver alternativas de controle biológico, através de microrganismos que sejam eficazes no controle de doenças foliares da bananeira.

3. MÉTODO

O presente projeto será realizado no laboratório de Microbiologia, no Centro Universitário Católica de Santa Catarina, em Joinville-SC.

3.1 Isolamento de microrganismos endofíticos e patógenos

As folhas de banana (caturra, prata e maçã-tropical) com e sem sintomas de doenças, serão coletadas em diferentes propriedades agrícolas, no município de Luiz Alves- SC, pela Eng Agrônoma Kelly Justin da Silva, parceira desse projeto.

Pedaços de folhas serão desinfectados superficialmente e inoculados em ágar batata dextrose (BDA) e ágar nutriente (NA) para o isolamento de fungos e bactérias endofíticas, e incubados em BOD a 28 °C. Os fungos patogênicos *M.*

fijiensis e *M. musicola* serão isolados a partir da captura de conídios diretamente das folhas com sintomas e depositados em meio de cultivo BDA (HANADA et al., 2002). A partir da coleção de fungos será realizado teste com os postulados de Koch e selecionados isolado patogênicos que causem lesões na folha de banana, para os testes preliminares de antagonismo. Esses fungos serão caracterizados morfolologicamente.

3.2 Testes de antagonismo dos isolados e dos extratos

Testes de antagonismo preliminares serão realizados contra patógenos previamente selecionados, em placas de co-cultivo e posteriormente serão realizados novos testes de antagonismo pela contra os patógenos causadores das sigatokas (MARMANN et al., 2014).

Após a seleção dos melhores antagonistas em placas, serão testados os extratos produzidos pelos mesmos. Para isso, cada microrganismo selecionado será crescido em meio de cultura líquido, conforme descrito em Savi et al. (2015). Os extratos que apresentarem melhor atividade serão selecionados para as análises da Concentração inibitória mínima (CIM) (TONIAL et al., 2017) e determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) (SANTOS et al., 2015). Os melhores extratos serão caracterizados por espectrometria de massas junto a empresa Acquaplant, a fim de identificar os compostos que podem ter ação inibitória ao crescimento dos fungos patogênicos.

3.3 Identificação molecular e caracterização morfológica dos isolados

Para identificação dos microrganismos isolados será feito o sequenciamento dos mesmos. Para isso, será realizada a extração de DNA dos fungos (RAEDER & BRODA, 1985) e bactérias por kit de extração (Wizard, Promega), a integridade do DNA será verificada em gel de agarose, corado com SybrGreen e observado em transiluminador-UV. O sequenciamento será realizado por empresa terceirizada (Ludwig Biotec). Para identificação de fungos serão

utilizados os pares de primers ITS1/ITS4, e para bactérias o par 8F/1541r. As sequências obtidas serão alinhadas e identificadas através da construção de árvores filogenéticas por meio de inferência bayesiana no software MrBayes 3.2.1. Além da identificação molecular, os fungos serão caracterizados quanto as características micro morfológicas, através da montagem de lâminas e observação em microscópio óptico.

3.4 Testes *in vitro*

O experimento *in vitro* será realizado em BOD com controle de temperatura e fotoperíodo. Cada microrganismo antagonista selecionado ou os extratos, dependendo dos resultados das etapas anteriores, serão aplicados em mudas de bananeira, que serão previamente crescidas em meio de cultivo MS. Os tratamentos serão: T1: testemunha sem inoculação de qualquer microrganismo; T2: inoculação de patógenos previamente isolados; T3 inoculação de patógenos + inoculação de um antagonista; T4 inoculação de patógenos + aplicação de fungicida e T5: inoculação do microrganismo antagonista. Dessa forma será possível observar as respostas das plantas quando submetidas ao patógeno e se o antagonista selecionado será capaz de combater a doença diretamente na planta. O experimento contará com quatro repetições por tratamento, onde será avaliado a incidência e severidade de doenças.

4. CRONOGRAMA

Atividades	2018					2019						
	A G O.	S E T.	O U T.	N O V.	D E Z.	J A N.	F E V.	M A R.	A B R.	M A I O	J U N.	J U L.
Revisão de literatura	X	X										
Coleta de folhas	X	X										
Isolamento de microrganismos	X	X	X	X	X							
Caracterização da coleção de fungos endofíticos			X	X	X							
Testes de antagonismo em placa					X	X	X					
Testes de antagonismo <i>in vitro</i>						X	X	X				
Identificação dos antagonistas, extração de DNA e sequenciamento								X	X			
Relatório Parcial							X					
Análise dos resultados							X	X	X			
Relatório Final										X	X	
Participação em Congresso										X	X	
Elaboração de artigo científico										X	X	X

5 RESUMO DO ORÇAMENTO:

		FERJ		
		Setor de Pesquisa		
Elementos de Despesa	Quantidade	Descrição	Preço Unitário R\$	
Participação em eventos				
Passagens e Despesa de Locomoção.				
Material de Consumo (descrever todos os itens ex: Papel A4, disquetes, etc..)	-	Reagentes químicos para realização das análises.	720,00 (valor total)*	
Aquisição de Livros				
Cópias monocromáticas, fotocópia colorida, fotos aéreas, mapas, plotagens, cópias em metro.				
Equipamentos e Material Permanente				
Outros	10	Serviço de terceiros (sequenciamento de DNA)	28,00	
TOTAL DO PROJETO			1.000,00	

- Com relação aos reagentes foi colocado o valor e não discriminados os reagentes nem mesmo as quantidades, tendo em vista que a compra dos mesmos será realizada de acordo com a obtenção dos resultados, não sendo possível assim, discriminar com exatidão a compra de cada item.

5. REFERÊNCIAS

AMIL, A.F., HEANEY, S.P. et al. Dynamics of Qol sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica during 2000 to 2003. **Phytopathology**, 97, 1451–1457, 2007.

AZEVEDO, J.L. & ARAÚJO, W.L. Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. **Fungi: multifacetated microbes**. Anam Publishers. p. 189–207. 2007.

CORREIA, M.; RODRIGUES, M.; PAÍGA, P.; DELERUE-MATOS, C. Fungicides. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 169–176, 2016.

HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L. & PEREIRA, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, 27 (2), 2002.

MARÍN, D.H., ROMERO, R.A., GUZMÁN, M. and SUTTON, T.B. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease**, 87, 208–222, 2003.

MARMANN, A.; AMAL, H.A.; LIN, W. et al. Co-Cultivation - A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, 2014.

PAL, K.K. & GARDENER, B.M. Biological control of plant pathogenes. **The Plant health Instructor**. V.2, p.1117-1142, 2006.

PARK, Y.H.; KIM, Y. et al. Fungal endophytes inhabiting mountain-cultivated ginseng *Panax gin*. Diversity and biocontrol activity against ginseng pathogens. **Scientific Reports**, 7: 16221, 2017.

SANTOS, I. P. et al. Antibacterial Activity of Endophytic Fungi from Leaves of *Indigofera Suffruticosa* Miller (Fabaceae), **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1–7, 2015.

SILVA, G.F.et al. Genetic diversity of *Mycosphaerella fijiensis* in Brazil analyzed using an ERIC-PCR marker. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.7698-7707, 2014.

TONIAL, F. et al. Biological activity of *Diaporthe terebinthifolii* extracts against *Phyllosticta citricarpa*. **FEMS Microbiology Letter**, v.1, p.1, 2017.