



Microrganismos endofíticos encontrados no fruto da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e seu potencial antimicrobiano

Gerodes Vasconcelos da Costa¹, Waldireny Caldas Rocha¹, Adriana Dantas Gonzaga de Freitas²

Resumo

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é encontrada em toda a bacia Amazônica, seus frutos são muito utilizados na culinária Amazônica. O cultivo da pupunheira começou a apresentar a incidência de diversas pragas. Pensando nisso o objetivo geral deste trabalho foi isolar, purificar, conservar os microrganismos encontrados no fruto da pupunheira e verificar se estes possuem um potencial antimicrobiano frente a algumas bactérias fitopatogênicas. Os frutos foram coletados no município de Coari, no Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões (CAPMEDSOL), no horário matutino e conduzidos ao laboratório de microbiologia, onde foi realizada assepsia do material e o isolamento das culturas em meio de cultura BDA e conservados em glicerol e castellani e onde foram realizados teste antagônicos com fungos e bactérias fitopatogênicas. Foram usados ANOVA para os testes estatísticos. Obtivemos resultados de atividade antagonista dos microrganismos isolados inibindo o crescimento dos fitopatógenos, no entanto não obtivemos diferenças estatísticas significativas entre si, portanto, novos testes estão sendo realizados para verificação das atividades antagonistas.

Palavras-Chave: antagonista; pupunha; isolados, antimicrobiano.

Abstract

Endophytic microorganisms found in the fruit of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) and its antimicrobial potential. The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) is found throughout the Amazon basin, its fruits are widely used in Amazonian cooking. With its expansion, the cultivation of peach palm began to show the incidence of several pests. Thinking about this general objective was to isolate, purify, conserve the microorganisms found in the fruit of peach palm and verify if they have an antimicrobial potential against some phytopathogenic bacteria. The fruits were collected in the municipality of Coari, at the Center for Research Support of the Middle Solimões (CAPMEDSOL), at the morning time and conducted to the microbiology laboratory, where the material asepsis and the isolation of the cultures in BDA culture medium and preserved in glycerol and castellani and where antagonistic tests were carried out with fungi and phytopathogenic bacteria. ANOVA was used for the statistical tests. We obtained results of antagonistic activity of the isolated microorganisms inhibiting the growth of the phytopathogens, however we did not obtain significant statistical differences among them, therefore, new tests are being performed to verify the antagonistic activities.

Key-words: Antagonist; peach palm, microorganism.

¹ Profa e aluno UFAM, ISB, Coari, Amazonas, Brasil.gerodesvasconcelos5@gmail.com

² Docente, ICB/UFAM, Departamento de Morfologia., Manaus, Amazonas Brasil. adrianadantas1@gmail.com



1. Introdução

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma planta classificada taxonomicamente como uma palmeira monocotiledônea da família Arecaceae, de grande porte, espinhosa, cespitosa e pode atingir até 20 metros de altura, possuindo estipes de 3 a 18 metros de comprimento e com diâmetro de 12 a 18 centímetros (Lorenzi, 2010; Parmejiani et al., 2013). É uma planta presente em diversos países da América do Sul e América Central, onde pode ser conhecida por diversos nomes em diversos países por “peach palm” e “pewa palm” (Trinidade), “pejibaye” (Costa Rica e Nicarágua), “piba” (Panamá), “pijiguao” e “macana” (Venezuela), “chontaduro” (Colômbia e Equador), “pijuayo” (Peru), “tembe” e “palma de Castilla” (Bolívia), “parepon” (Guiana Francesa) e pupunheira (Brasil) (Mora-Urpí et al., 1997; Lorenzi, 2010).

Seu fruto possui um alto valor nutricional (Camacho, 1970). Do estipe se retira o palmito, produto que representa seu maior potencial econômico, pois, é uma cultura de ciclo curto e altamente rentável em comparação com outras palmeiras produtoras de palmito (Clement, 1987).

O principal uso do fruto é na forma inteira, como parte do lanche ou do café de manhã, são de tamanho e formato variáveis, organizados em cachos, o tamanho dos frutos pode variar de 1 a 1,5 cm de diâmetro nos frutos sem caroço até 7 cm nos frutos normais e o formato varia entre ovoide a cônico, possui um epicarpo fibroso que varia de cor podendo ser verde quando imaturos e ser amarelo claro, laranja ou vermelho quando maduros.

Em função de sua domesticação ter se processado por tribos nômades, no seu habitat, ela sofre menos o ataque de pragas e doenças. No entanto, quando plantada em condições de monocultivo, tornou-se suscetível a vários patógenos (Jöhr, 1999).

Doenças em plantas geralmente são causadas por vários agentes etiológicos, em geral esses agentes são fungos, bactérias, vírus e nematóides, responsáveis por pequenas ou grandes perdas que podem ser fatores limitantes a uma determinada cultura (Pozza et al., 1999). Como microrganismos causadores de doenças da pupunha, destacam-se os fungos *Thielaviopsis paradoxa* e *Chalaropsis thielavioides* porque colonizam rapidamente a polpa, penetrando e apodrecendo a semente (Hernández et al., 1999).

Pensando nisso o trabalho teve como objetivo geral isolar os microrganismos encontrados no fruto da pupunheira e verificar as possíveis atividades antagonistas destes frente a microrganismos fitopatogênicos.

2. Material e Método

Coleta das pupunhas

O fruto da pupunheira foi coletado no município de Coari, no Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões no horário matutino, e transportado para o Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, ISB-UFAM.

Esterilização do material biológico e isolamento dos microrganismos

Os frutos da pupunheira foram lavados e cortados em pequenos fragmentos em matrizes de 2 x 2 e inoculados, utilizado a assepsia do material segundo a metodologia para isolamento dos microrganismos endofíticos (Araújo, 2002), foram isolados em duplicata, em placas de Petri contendo meios de cultura sólidos BDA (Batata Dextrose Ágar), onde foram adicionados ao meio de cultura antibiótico (tetraciclina) para inibição do crescimento de bactérias.

Em seguida as placas de Petri com as amostras foram transferidas para estufa tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) a 26°C durante 7 dias para o crescimento das colônias microbiológicas. Após este tempo, foi realizada a repicagem das amostras inoculadas, transferindo fragmentos de ágar, para novas placas contendo o referido meio de cultura BDA, até a obtenção das linhagens puras de fungos e bactérias.

Identificação dos microrganismos

Para a identificação dos isolados, realizaram-se observações macroscópicas da colônia (crescimento, coloração, textura e pigmento difuso) e observações microscópicas das estruturas vegetativas (hifas) por meio de microcultivos.

Atividade antagonista

O antagonismo foi ensaiado pelo método de cultura pareada, ou simplesmente pareamento, que consistiu no confronto direto do antagonista (bactérias fitopatogênicas, *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. e os fungos, *Agrobacterium* sp., *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp.,



Ciências Biológicas

Aspergillus sp.) e dos microrganismos encontrados na pupunha.

Foram utilizados microrganismos conservados de projetos e que estão no Laboratório de Microbiologia do ISB/UFAM. Foram utilizadas 60 bactérias fitopatogênicas e cultivados em placas de Petri com meio BDA (Batata Dextrose Ágar), pH 6,8 a 28°C, de 7 a 14 dias. Onde foram retirados cilindros de ágar de 5 mm de diâmetro, das bordas das colônias dos fungos em crescimento. As bactérias foram inoculadas em BDA, por 18 a 22 horas a 37°C. Após este período, foram coletadas por meio de uma alça de platina e a seguir também transferidas para as placas do ensaio. O cilindro de meio de cultura contendo o fungo alvo a ser inibido bem como a bactéria atuando como possível agente inibidor foram colocados em polos opostos equidistantes a 1 cm da borda interna da placa de Petri onde foram realizados os ensaios. Durante a incubação, foi analisada a inibição do crescimento do fungo simbiote.

Os testes foram realizados em triplicata e foram utilizados como controle placas contendo somente o fungo e somente as bactérias. No qual foram analisados o halo de inibição.

3. Resultados e Discussão

Purificação dos microrganismos

Foram isolados 60 fungos da pupunha e 15 bactérias, eles foram analisados por meio das características macroscópicas e microscópicas. O aspecto macromorfológico das colônias dos isolados foi examinado a olho nu, com atenção especial ao crescimento micelial, a forma das bordas a presença de pigmento difuso, a textura e a coloração de colônia. Observou-se o crescimento de fungos com colorações esverdeadas, amareladas marrons e brancas. Alguns com texturas liguenta e alguns esporulentos. Foi notada presença de hifas, de conidióforo sem os conídios, e conídios de forma dispersa. Para as bactérias teve-se tanto Gram positivas como Gram negativas.

O aspecto micromorfológico das estruturas vegetativas e reprodutivas foi examinada sob microscopia de luz, em aumento total de 1000x, durante o teste pode-se observar estrutura de hifas amadurecidas.

Atividade antagonista

Após a análise das características macroscópicas e microscópicas dos fungos encontrados no fruto da pupunha (*B. gasipaes*) foram iniciados os testes de antagonismo.

Das 3 bactérias fitopatogênicas utilizados contra os 60 fungos isolados da pupunha, 33 apresentaram resultado negativo e 27 apresentaram resultados positivos de antagonismo. No entanto, não apresentaram diferenças estatísticas segundo o teste ANOVA a 5% de significância.

Vários trabalhos sobre atividade antagonista vêm comprovando a importância do uso de microrganismo como controle biológico sobre várias pragas causadoras de doenças fitopatogênicas. Quando se pensa em antagonismo microbiano (uma situação em que um microrganismo aciona seu arsenal de recursos para inibir o crescimento e a multiplicação de outro ou mesmo de provocar sua morte) há que se pensar em múltiplas possibilidades, como competição por nutrientes e por nichos ecológicos (Lim et al., 2002). Os testes com esses isolados demonstraram alguns resultados com relação ao poder de inibição desses microrganismos.

Artley (1921) descreveu um dos primeiros trabalhos envolvendo a introdução consciente de antagonistas visando o controle biológico de enfermidades de plantas aconteceram no início do século XX, nas décadas de 1920-1940.

Os resultados foram negativos, não apresentando atividade antagonista entre os microrganismos isolados da pupunha e os fungos fitopatogênicos (*Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.).

Por esse motivo o segundo teste antagonista teve continuação com bactérias fitopatogênicas.

O teste com bactérias fitopatogênicas obtiveram resultados positivos. Segundo Lima et al., (2002), a produção de substâncias antimicrobianas por microrganismos, como forma de exercer antagonismo sobre outros microrganismos, é praticamente universal.

Vários trabalhos utilizando microrganismos como controle biológico já foram realizados. Chin-A-Woeng et al., (2003) comentam que bactérias, como as espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas*, são muito versáteis em produzir substâncias antimicrobianas com propriedades antifúngicas e antibacterianas.

O uso de microrganismo como agente no controle biológico vem sendo estudada a anos. Na



Ciências Biológicas

década de 1980, Milton Schroth e seu grupo, nos EUA, foram de imensa importância na pesquisa com controle biológico (Schroth e Becker, 1990).

Silva, *et al.*, (2008) relatou no seu trabalho sobre atividade antagonista *in vitro* que isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de inibir o crescimento micelial do fungo *Phytophthora citrophthora*.

Obtivemos resultados satisfatórios das bactérias fitopatogênicas utilizadas nos testes de antagonismo a ação antagonista contra, pelo menos, 10 fungos encontrado no fruto da pupunha.

Com tais resultados satisfatórios, o próximo passo do trabalho é realizar a identificação molecular dos isolados da pupunha, para a realização de outros experimentos.

4. Conclusão

Os resultados obtidos nos testes antagonistas foram satisfatórios, estudos demonstraram que o uso de micro-organismos como controle biológico para microrganismo causadores de doenças é promissor, porém uma análise mais detalhada na identificação desses microrganismos é necessária. Durante o trabalho pode-se observar resultados mais positivos quando se trata de atividade antagonista em fungos contra as bactérias.

Para analisar com mais exatidão o uso desse microrganismo justifica-se estudos mais detalhados.

Agradecimentos

Ao CNPq e a FAPEAM pelo auxílio da bolsa.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

Araújo, I.C. 1991. Aspectos técnicos da implantação da cultura da pupunheira para produção de palmito. In: **A pupunheira e suas potencialidades econômicas**. Sec. Est.

Produção Rural e Abastecimento (SEPROR), Manaus, AM. pp. 1-38.

Azevedo, J.L.; Costa, S.O.P. 1973. **Exercícios práticos de genética**, São Paulo: EDUSP, 288p.

Camacho, V.E.; Soria, J.V. 1970. Pejibaye palmcore. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v.14, p.122-132.

Castellani, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.24, p.270-276.

Chin, J.W, Cropp, T.A., Anderson, J.C., Mukherji, M., Zhang, Z., Schultz, P.G. 2003. An expanded eukaryotic genetic code. **Science** 301: 964-967 p.

Clement, C. R. 2000. **Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae) Serie Frutas Nativas**, Jaboticabal: Funep, 48p.

Clement, C. R; Mora Urpí, J. 1987. The pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K., Arecaceae): multi-use potential for the lowland humid tropics. **Economic Botany**, v. 41, n. 2, p. 302-311.

Clement, C.R. 1987. Pupunha, uma árvore domesticada. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.5, p.66-73.

Gasparotto, L; Garcia, M. Aspectos fitossanitários no cultivo da pupunheira: situação atual e riscos futuros. In: **Seminário do Agronegócio palmito de pupunha na Amazônia**, Anais. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, p. 72-74. 1999. (EMBRAPA-CPAF RONDONIA. Documentos, 41).

Guerreiro, L. F. 2002. **Palmito de Pupunha**. Desenharia: Agencia de Fomento do Estado da Bahia, Bahia.

Hartley, C. 1921. Damping – off in forest nurseries. **US Dept Agric Bull** 934, 1-99 p.

Hartley, C.W.S. 1977. **The oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq.** Longman, London.

Hernández, C.G; González, E.V; Vargas, R.G.N; Figueroa, L.S; Badila, M.Q. & Meza, J.M. 1999. Malezas, enfermedades y plagas: sumanejo integral. In: **Palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth): su cultivo e industrialización**. Mora-Urpí, J. & Echeverría, J.G. (eds.). 1ª ed., San José, Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica, 260p.



Ciências Biológicas

- Jöhr, J. Estadísticas del mercado interno de Brasil, In: MORA-URPI, J.; GAINZA-ECHVERRÍA, J. (eds). **Palmito de Pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth): Su cultivo e industrialización**. San Jose: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1999. p.220-222.
- Kerr, L. S.; Clement, R. N. S.; Clement, C. R.; Kerr, W. E. 1997. **Cozinhando com a Pupunha**. Manaus: INPA, 95p.
- Lorenzi, H. **Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. 384 p.
- Luz, E. D. M. N.; Matsuoka, K. 2001. *Phytophthora*: Fungo protista ou Chromista? In: Luz, E. D. M. N.; Santos, A. F. dos; Matsuoka, K.; Bezerra, J. L. (Ed.), **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: [s.n], p.1-22.
- Mora-Urpí, J; Weber, J.C; Clement, C.R. 1997. **Peach palm. *Bactrisgasipaes* Kunth: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, n. 20, 83 p.
- Nakasone, K. K; Perterson, S. W; Jong, S. C. 2004. **Preservation and distribution of fungal cultures**.
- Nogueira, O. L. 1995. **A Cultura da Pupunha**. 1. ed. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. (Coleção Plantar; 25).
- Paim, M. C. A. 2005. **Diversidade Genética, Taxonomia e Patogenicidade de *Phytophthora citrophthora* e *P. palmivora***. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual Santa Cruz, Ilhéus, 98 p.
- Parmejiani, R. S. 2013. **Avaliação da sensibilidade de sementes de pupunha à dessecação**. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- Pereira, A.B.; Bezerra, J.L. 1994. Necrose da espata da pupunheira causada por *Lasiodiplodia theobromae* na Bahia, Brasil. **Agrotropica** v.6, n.2, p.61-63.
- Petrini, L.E. & Müller, E. 1986. Haupt-und Nebenfruchtformen Europaischer Hypoxylon Arten (*Xylariaceae, Sphaeriales*) und verwandter Pilze. **Mycologia Helvetica**, v.1, p.501-627.
- Pimenta Neto, A. A.; Santos, M. V. O. dos; Paim, M. C. A.; LUZ, E. D. M. N. 2009. Há possibilidade de infecção cruzada entre isolados de culturas hospedeiras de *Phytophthora palmivora* na Bahia. **Tropical Plant Pathology** v. 34. p. 370-370.
- Pizzinatto, M.A., Bovi, M.L.A., Feichtenberg, E. & Spiering, S.H. 2002. Ocorrência da podridão do estipe em pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica** 28:363-365.
- Pozza, E.A; Souza, P.E; Castro, H.A; Pozza, A.A.A. 1999. Frequência da ocorrência de doenças de plantas na região de Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.4, p.1002-1006.
- Schroth, M.N., Becker, J.O. 1990. Concepts of ecological and physiological activities of rhizobacteria related to biologic control and plant growth promotion. In: Hornby, D. (Ed.). **Biological control of soil-borne plant pathogens**. Wallingford: C.A.B. Internacional, 389-414 p.
- Silva, K. S. 2008. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, out./dez. 2008
- Sodre, L. E. A. 2014. **Elaboração, avaliação Físico-Química, microbiológica e sensorial de doce de pupunha (*Bactris gasipaes*). Monografia (Bacharelado em Engenharia de Alimentos)**. Fundação Universidade Federal de Rondônia. Departamento de Engenharia de Alimentos, Ariquemes-RO.
- WILSON, E. O. **The insects societies**. Cambridge: Belknap, 2004. 548p.
- YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil**. Sao Paulo: Hoehnea, 2002.v. 2, p. 1-266.
- ZANETTI, R. et al. **Manejo integrado de pragas florestais**. Lavras: UFLA. 2004. 119 p.
- Zar, J. H. **Biostatistical analysis**. 2nd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. 1984. 110 p