

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL



**Anais da XVI Jornada
de Iniciação Científica da
Embrapa Amazônia Ocidental**

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da XVI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Cláudia Majolo
Inocencio Junior de Oliveira
Jony Koji Dairiki
Maria Geralda de Souza
Ronaldo Ribeiro de Moraes
Editores Técnicos*

Embrapa
Brasília, DF
2020

Embrapa Amazônia Ocidental
Rodovia AM-010, Km 29,
Estrada Manaus/Itacoatiara,
Manaus, AM
69010-970
Caixa Postal 319
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Unidade responsável pelo
conteúdo e edição**
Embrapa Amazônia Ocidental

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente
Everton Rabelo Cordeiro

Secretária-executiva
Gleise Maria Teles de Oliveira

Membros
José Olenilson Costa Pinheiro, Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa e Maria Perpétua Beleza Pereira

Revisão de texto
Maria Perpétua Beleza Pereira

Normalização bibliográfica
Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa

Projeto gráfico e editoração eletrônica
Gleise Maria Teles de Oliveira

1ª edição
Publicação digital (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Amazônia Ocidental

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (16 : 2019 : Manaus).
Anais da XVI Jornada Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / Claudia Majolo ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2020.
PDF (130 p.) : il. color.

ISBN 978-65-86056-10-5

1. Iniciação científica. 2. Comunicação científica. 3. Pesquisa. I. Majolo, Cláudia. II. Título. III. Embrapa Amazônia Ocidental.

CDD 501

Prospecção de substâncias inibitórias do crescimento micelial in vitro de *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa do cupuaçuzeiro

Felipe Morais Cordeiro¹

Maria Geralda de Souza²

Marcelo Róseo de Oliveira³

Francisco Célio Maia Chaves⁴

Larissa Brasil Franco⁵

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de óleos essenciais de plantas da família Piperacea sobre o desenvolvimento de micélio *Moniliophthora perniciosa*, isolado de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), pelo método de microdiluição. Isolados do fungo provenientes de basidiocarpos coletados de vassoura-de-bruxa de cupuaçuzeiro seca foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-sacarose-ágar (BDSA). Os testes foram realizados pela técnica de microdiluição (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003) em meio líquido batata-sacarose (BS) e Tween a 0,5%, contidos em placas de células com 96 poços estéreis. Cada óleo essencial foi pesado e diluído em meio líquido de batata-sacarose (BS) + 200 μL de Tween a 0,5%, homogeneizado de modo a se obter as seguintes concentrações: 0 mg mL^{-1} , 11,990 mg mL^{-1} , 19,980 mg mL^{-1} , 33,310 mg mL^{-1} , 55,520 mg mL^{-1} , 92,530 mg mL^{-1} , 154,20 mg mL^{-1} , 257,00 mg mL^{-1} e 428,4 mg mL^{-1} . Posteriormente,

¹Bolsista de Iniciação Científica, Pibic/Fapeam/Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

²Engenheira florestal, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

³Biólogo, doutor em Biotecnologia, analista da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

⁴Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Horticultura), pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

⁵Bolsista de Iniciação Científica, Paic/CNPq/Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

300 μL do meio com o óleo em cada concentração foram distribuídos em placa de cultura de células de 96 poços. Após a distribuição seccionaram-se pequenos discos de micélio com 0,5 mm e repicados da extremidade de colônias do fungo com 5 dias de crescimento ativo. As placas foram fechadas e incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. A eficiência dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum*, *Piper dilatatum* e *Piper marginatum* foi superior a de outros óleos testados. Os óleos essenciais de *Piper captarianum* e *Piper hispidum* têm potencial para controle de *M. pernicioso*, sendo a redução do crescimento micelial diretamente proporcional ao aumento das concentrações.

Termos de indexação: microdiluição, óleos essenciais, Piperaceae.

Prospection of inhibitory substances of in vitro micelial growth of *Moniliophthora pernicioso*, causal agent of cupuaçuzeiro brown broom

Abstract – The purpose of this work was to evaluate the effect of essential oils from plants of the Piperaceae family on the mycelial development of *Moniliophthora pernicioso*, using the microdilution method. The fungus isolates were obtained from basidiocarps collected from dried cupuaçuzeiro witches' brooms and grown in potato, dextrose, sucrose and agar (BDSA). The tests were carried out by the microdilution technique (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003) in potato, sucrose (BS) and 0.5% Tween liquid medium, contained in cell plates with 96 sterile wells. Each essential oil was weighed and diluted in liquid medium BS + 200 μL of 0.5% tween and homogenized in order to obtain the following concentrations: 0 mg mL^{-1} , 11,990 mg mL^{-1} , 19,980 mg mL^{-1} , 33,310 mg mL^{-1} , 55.520 mg mL^{-1} , 92.530 mg mL^{-1} , 154.20 mg mL^{-1} , 257.00 mg mL^{-1} and 428.4 mg mL^{-1} . Subsequently, 300 μL of the medium with the different concentrations of the oil were distributed in each well of the cell culture plate. Next, small mycelium discs, 0.5 mm in diameter, were

sectioned from the end of the fungus colonies, with five days of active growth, and deposited over each orifice. The plates were closed and the colonies incubated at $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 hours. The efficiency of a *Piper aduncun*, *Piper hispidinervum*, *Piper dilatatum* and *Piper marginatum* essential oils in reducing the mycelial growth of *M. pernicioso* was superior to the other tested oils and directly proportional to the increase in concentrations.

Index terms: microdilution, essential oils, Piperacea.

Introdução

O fungo *M. pernicioso* é o agente causal da vassoura de bruxa, principal doença do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). Além do cupuaçuzeiro, o fungo afeta outras espécies de plantas, inclusive do gênero *Theobroma*, sendo o *Theobroma cacao* o mais importante, em que o ataque severo da doença pode dizimar plantações (Bastos, 1990). As infecções do patógeno ocorrem nos tecidos meristemáticos das plantas, como os novos lançamentos foliares, flores, frutos jovens, provocando hiperplasias com intensas brotações nos ramos laterais, queda e secamento das flores e paralisação do crescimento e posterior mumificação dos frutos, o que acarreta sérios prejuízos aos agricultores (Lima; Souza, 1998). Em decorrência desses danos causados por vassoura de bruxa, diversas tentativas de controle dessa doença são desenvolvidas, tais como a poda fitossanitária, que consiste na remoção de partes doentes da planta, e uso de materiais resistentes à doença. Não há, até o momento, nenhum produto químico registrado para o controle da doença em cupuaçuzeiro, sendo que a busca por alternativas de controle, como o biológico, o uso de extratos, óleos essenciais e substâncias de plantas medicinais, por exemplo, pode caminhar para o desenvolvimento de um sistema de cultivo agrícola mais sustentável com menor uso de agrotóxico (Silva; Bastos, 2007). Portanto, a prospecção de substâncias capazes de influenciar o crescimento micelial de *M. pernicioso* in vitro, além

de permitir o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para realização dessas análises, poderá contribuir posteriormente para conhecimento dos mecanismos moleculares relacionados à inibição do desenvolvimento do fungo, com efeito no desenvolvimento de formulações a serem utilizadas nas estratégias de controle da doença. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de substâncias de óleos essenciais de plantas da família Piperacea sobre o desenvolvimento de micélio *M. perniciosa* isolado de cupuaçuzeiro pelo método de microdiluição.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental. O isolado de *M. perniciosa* utilizado no experimento foi proveniente de basidiocarpos coletados de vassouras-de-bruxa de cupuaçuzeiro secas. O cultivo do micélio foi feito em meio de cultura batata-dextrose-sacarose-ágar (BDSA). Foram selecionados os óleos *P. marginatum*, *P. hispidum*, *P. aduncum*, *P. dilatatum*, *P. hispidinervum* e *P. capitarianum* para os testes quanto à inibição do crescimento micelial do fungo. Os óleos foram extraídos pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, no Laboratório de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Ocidental. Cada óleo essencial foi pesado e diluído em meio líquido de batata-sacarose (BS) + 200 μL de Tween a 0,5%, homogeneizado de modo a se obter as seguintes concentrações: 0 mg mL^{-1} , 11,990 mg mL^{-1} , 19,980 mg mL^{-1} , 33,310 mg mL^{-1} , 55,520 mg mL^{-1} , 92,530 mg mL^{-1} , 154,20 mg mL^{-1} , 257,00 mg mL^{-1} e 428,4 mg mL^{-1} . Posteriormente, 300 μL do meio com o óleo em cada concentração foram distribuídos em placa de cultura de células de 96 poços. Após a distribuição seccionaram-se pequenos discos de micélio com 0,5 mm, repicados da extremidade de colônias do fungo com 5 dias de crescimento ativo. Os discos foram imersos na solução de cada óleo em cada concentração por um período de 72 horas. Após esse tempo, eles foram repicados para placa de Petri contendo meio de batata-dextrose-saca-

rose-ágar (BDSA) e incubados a 25 °C. A avaliação foi realizada após 4 dias com a medição do diâmetro do crescimento radial da colônia. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições e nove concentrações.

Resultados

O crescimento micelial de *M. pernicioso* foi inibido totalmente a partir da concentração de 11,99 mg mL⁻¹ dos óleos essenciais de *P. aduncum*, *P. hispidinervum*, *P. dilatatum* e *P. marginatum* (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro médio das colônias (cm) de *Moniliophthora pernicioso* com óleo essencial de *Piper*.

Concentrações (mg mL ⁻¹)	<i>Piper aduncum</i>	<i>Piper marginatum</i>	<i>Piper hispidinervum</i>	<i>Piper hispidum</i>	<i>Piper capitarianum</i>	<i>Piper dilatatum</i>
0	3,6	3,0	3,45	3,3	3,05	3,05
11,99	0	0	0	3,3	2,55	0
19,98	0	0	0	2,85	0	0
33,31	0	0	0	0,9	0	0
55,52	0	0	0	0,85	0	0
92,53	0	0	0	0	0	0
154,2	0	0	0	0	0	0
257,0	0	0	0	0	0	0
428,4	0	0	0	0	0	0

Não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos da concentração inicial e a testemunha para o óleo essencial de *P. capitarianum* ($n = 36$; $t = 2$; $P < 0,092$) (Tabela 2), entretanto não houve crescimento micelial nas demais concentrações (Figura 1).

Tabela 2. Diâmetro médio das colônias de *Moniliophthora perniciosa* com óleo essencial de *Piper capitarianum*.

Concentrações (mg mL ⁻¹)	Diâmetro médio da colônia (mm)
0	28,25 a
11,99	26,25 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t ($P < 0,092$).

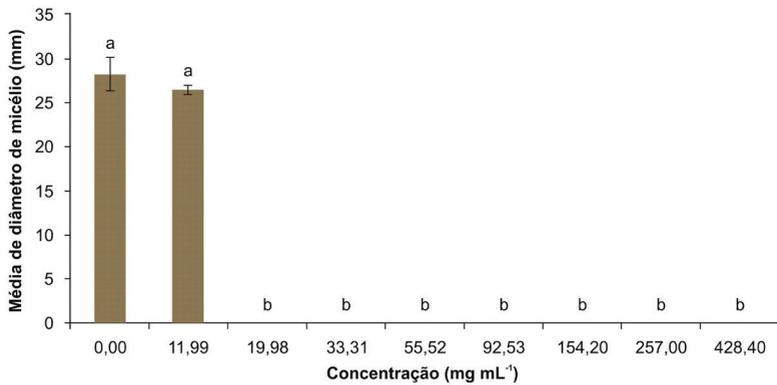


Figura 1. Crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* nas diferentes concentrações de *Piper capitarianum*.

Fonte: Felipe Cordeiro (2019).

A inibição do crescimento do fungo pelo óleo essencial de *P. hispidum* ocorreu a partir da concentração de 92,53 mg mL⁻¹, entretanto houve diferença estatística entre os tratamentos das concentrações 33,31 mg mL⁻¹ e 55,52 mg mL⁻¹ ($n = 36$; $F = 82,133$; $P < 0,001$), (Figura 2).

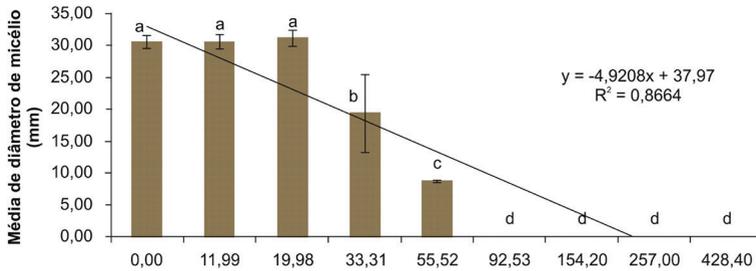


Figura 2. Crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* nas diferentes concentrações de *Piper hispidum*.

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($P < 0,001$).

Fonte: Felipe Cordeiro (2019).

Discussão

Os óleos essenciais de *P. marginatum*, *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. dilatatum* agiram como fungicida. Entre as atividades atribuídas ao óleo essencial de *P. aduncum* estão as: antibacterianas, inseticidas, larvicidas, de inibição das enzimas citocromo P450 e epoxidase (Pohlit et al., 2006; Silva; Bastos, 2007). Silva et al. (2013) verificaram que a germinação de esporos de *M. perniciosa* apresentou 100% de inibição nas concentrações de 0,5; 0,75; 1,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de *P. hispidinervum*. Em seus estudos, Feitosa et al. (2016) observaram inibição total do crescimento micelial de *M. perniciosa* utilizando o método de disco de difusão nas concentrações de 25%, 50% e 75%/vv do óleo essencial de *P. marginatum*. Por outro lado, Silva e Bastos (2007) verificaram que o óleo de *P. marginatum* nas concentrações de 0,75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foi efetivo na inibição em 100% de crescimento dos fungos *Crinipellis perniciosa*. Diante desses resultados devem ser testadas concentrações menores que 11,99 mg mL^{-1} para os óleos de *P. marginatum*, *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. dilatatum*, para se determinar a concentração mínima de inibição do fungo.

Conclusão

Conclui-se que a eficiência dos óleos essenciais de *P. aduncun*, *P. hispidinervum*, *P. dilatatum* e *P. marginatum* foi superior a dos outros óleos testados. Os óleos essenciais de *P. capitarianum*, *P. hispidum* têm potencial para controle de *M. pernicioso*, sendo a redução do crescimento micelial diretamente proporcional ao aumento das concentrações.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), pela concessão da bolsa de iniciação científica do Programa Paic; ao Dr. Francisco Célio Maia Chaves, pela disponibilidade dos óleos essenciais; ao Dr. Adauto Maurício Tavares, pelas análises estatísticas; a Pamela Keiko Harada, pelas sugestões apresentadas; e a Ricardo Rebelo Pessoa, pelo apoio e ensinamentos no laboratório.

Referências

- BASTOS, C. N. **Epifitologia, hospedeiros e controle da vassoura-de-bruxa *Crinipetlls pernicioso* (Stahel) Singer**. Ilhéus, BA: CEPLAC/CEPEC, 1990. 21 p. (Boletim Técnico, 168).
- FEITOSA, A. J. C.; SOUZA, M. G. de; ALMEIDA, O. C.; SOUZA, A. das G. C. de; OLIVEIRA, M. R. de; CHAVES, F. C. M. Avaliação do óleo essencial de *Piper marginatum* sobre *Moniliophthora pernicioso*, causador da vassoura-de-bruxa no cupuaçuzeiro. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 12., 2015, Manaus. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2016. p. 35-36. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144510/1/XII-Jornada-IC-35a36.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2020.

LIMA, M. I. P. M.; SOUZA, A. das G. C. de. **Diagnose das principais doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) e seu controle**. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998. 18 p. (EMBRAPA-CPAA. Documentos, 9). Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAA-2009-09/2032/1/Doc_9_98.pdf. Acesso em: 20 mar. 2020.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6. Wayne, Pa, USA, 2003.

POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; MAUSE, R. *Piper aduncum* L.: planta pluripotente e fonte de substâncias fitoquímicas importantes. **Revista Fitos**, v. 2, n. 01, p. 7-18, jun./set. 2006.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, M. S.; SOUZA, M. G.; ALMEIDA, O. C.; SOUZA, A. C.; CHAVES, F. C.; MAJOLO, C.; TAVARES, A. M. Efeito do óleo essencial de *Piper hispidinervum* sobre *Moniliophthora pernicioso*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 46.; REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO, 11., 2013, Ouro Preto. **Expofito**. Ouro Preto: UFV, 2013. 1 CD-ROM. Resumo:94-1. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91656/1/Cupuacu-46-Congresso-Brasileiro-de-Fitopatologia.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2020.