PLANO DE TRABALHO
PROJETO ESTRATÉGICO – FUNDO PARANÁ/SETI

UNIDADE GESTORA DO FUNDO PARANÁ – **UGF**

APROVADO FL: 04

JOÃO CARLOS GOMES
Secretário da SETI

1. ÁREA PRIORITÁRIA

Selecione **uma** das áreas listadas, entre aquelas aprovadas pelo CCT – PARANÁ, na qual o projeto se enquadre, acessando o link: http://www.seti.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=15

Área Prioritária: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E BIOTECNOLOGIA

2. TÍTULO DO PROJETO

Seleção de novos inoculantes microbianos agrícolas com atividade fitossanitária e / ou promotora do crescimento de culturas de interesse do Paraná.

3. VALOR TOTAL DOS RECURSOS SOLICITADOS AO FUNDO PARANÁ = (a)

Outras despesas de CUSTEIO	INVESTIMENTOS	Total
R$ 88.000,00	**R$ 22.000,00**	**R$ 100.000,00**

4. ESTIMATIVA DE PRAZOS PARA EXECUÇÃO DO PROJETO

Duração: ( ) 12 meses ( ) 24 meses (x) 36 meses

Início: A partir da data da assinatura do Termo Jurídico.

5. INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CNPJ: 79.151.312/0001-56
Natureza Jurídica: Autarquia Estadual
Endereço: Av. Colombo, 5.790
CEP: 87.020.900
Cidade/Estado: Maringá - Paraná
Telefone e Fax: (44) 3011-4200
e_mail: sec-gre@uem.br

6. REPRESENTANTE LEGAL DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome: MAURO LUCIANO BAESSO
Cargo/Função: Reitor
Cédula de Identidade (Instituto/Estado da Federação): 1.883.579
CPF: 387.386.519-04
Endereço residencial: Av. Parigot de Souza, 198
CEP: 87010-440
Cidade/Estado: Maringá - Paraná
Telefone residencial: (44) 3301-8013
e_mail particular: mlbaesso@uem.br

7. COORDENADOR TÉCNICO/CIENTÍFICO DO PROJETO

Nome: JOÃO ALENCAR PAMPHILE
Cédula de Identidade (Instituto/Estado da Federação): 10.733.143-3
CPF: 931250467-34
Formação profissional: PROFESSOR
Titulação (graduação e pós-graduação): LIC. – BIOLOGIA; DOUTOR EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS
Telefone(s), celular e Fax: 44998985499
Endereço residencial: Rua Pioneiro João Nunes, 1380
CEP: 87047540
Cidade/Estado: Maringá / PR
e_mail: japamphile@uem.br

SETI PTG Fl. 05

12. Equipe do projeto (recursos humanos)

N°	Nome	Instituição	Formação	Função no projeto	e_mail	Telefone (fixo e celular)
1	João Alencar Pamphile	UEM	Doutor	Coordenador	japmphile@uem.br	44998985499
2	Julio Cesar Polonio	UEM	Mestre	Participante	Julioc_polonio@hotmail.com	30114893 44-991497042
3	Andressa Domingos Polli	UEM	Mestre	Participante	andressa_polli@hotmail.com	30114893 999253009
4	Marcos A. dos Santos Ribeiro	UEM	Doutor	Participante	marcosquimicauem@hotmail.com	30114893
5	Halison Correia Golias	UEM	Mestre	Participante	halisontj@hotmail.com	30114893
6	Cintia Zani Fávaro Polonio	UEM	Especialista	Participante	cintiazanifavaropolonio@gmail.com	30114893
7	Shalene da Silva Santos	UEM	Mestre	Participante	shaleness@gmail.com	30114893
8	Bruno Cesar do Espirito Santo	UEM	Mestre	Participante	secb140@hotmail.com	30114893
9	Verci Alves de Oliveira Junior	UEM	Especialista	Participante	vercijuniorbio@gmail.com	30114893
10	Anderson Emmer	UEM	Graduado	Participante	e.mm.mer@hotmail.com	30114893
11	João Arthur dos Santos de Oliveira	UEM	Mestre	Participante	joaoarthur_oliveira@hotmail.com	30114893
12	Rodrigo Pawloski Schoffen	UEM	Mestre	Participante	rps_ro@hotmail.com	30114893
13	Angela Aparecida da Silva	UEM	Mestre	Participante	angela-bio1@hotmail.com	30114893
14	João Lucio Azevedo	USP	Pós-Doutor	Pesquisador	jlazevedo@usp.br	41-9997812276

13. DESCRIÇÃO DO PROJETO

13.1 PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

(Identificar o problema ou entraves tecnológicos que o projeto se propõe a solucionar ou minimizar, com os respectivos argumentos).

13.1.1. Justificativa da proposta:

Nos últimos dez anos foram isolados no laboratório de Biotecnologia Microbiana da UEM (LBiomic) micror-oganismos endofiticos, fungos e bactérias, de diferentes plantas de interesse agronômico, como por exemplo *Piper hispidum* Swartz, *Malpighia emarginata*, *Saccharum* sp., *Coffea arabica* L. cv. IAPAR-59, *Morus nigra*, *Vitis labrusca* L.

A seleção de endófitos que atuem no controle de fitopatógenos, e que produzam compostos com atividades biológicas e potenciais reagentes, abrem um campo de produção de novos insumos, na forma de inoculantes ou formulações químicas de origem microbiana com menor impacto ambiental, para culturas importantes.

A busca de novas linhagens de fungos para à aplicação na forma de inoculantes agrícolas, produção de compostos orgânicos, representa um grande nicho de exploração para a substituição do uso de fungicidas, herbicidas, entre outros compostos com atividades relacionadas a ações biológicas de doenças e na produção de compostos com grande potencial na área de síntese orgânica. Além disso, se destaca o fato de que as linhagens a serem testadas foram previamente isoladas na condição de endófitos, o que possibilita a fixação destas linhagens na planta, de forma assintomática, reduzindo possivelmente o número de aplicações, pela possibilidade de colonização da planta hospedeira de forma persistente.

Nos últimos 3 anos, foram obtidos, no LBIOMIC, importantes resultados quanto à inibição / controle do crescimento de fitopatógenos *in vitro e in vivo*, capacidade de endófitos de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e de produzir AIA, reforçando a importância do prosseguimento da pesquisa com esses micro-organismos. Algumas bactérias endofíticas apresentaram potencial como Promotoras de Crescimento Vegetal, podendo ser, portanto, no futuro, empregadas como possíveis inoculantes agrícolas. Assim vê-se a necessidade de iniciar-se uma nova etapa no LBIOMIC que é a realização de ensaios para o desenvolvimento de produtos na forma de inoculantes. Para estabelecer as propriedades destes microrganismos, é necessária a realização de experimentos que visem a identificação do micro-organismo, via estudo molecular e análise filogenética baseados no sequenciamento do DNA; a elucidação do potencial da produção de substâncias bioativas no controle de patógenos microbianos de plantas; prospecção de endófitos para promoção do crescimento vegetal (AIA, Fixação do nitrogênio, solubilização do fosfato), assim, serão catalogados diversos endófitos com atividade biológica de interesse para a Biotecnologia aplicada à Agricultura (atividades fitossanitárias e promotoras do crescimento vegetal), sendo que o(s) isolado (s) de maior destaque serão utilizados no desenvolvimento de inoculante (s) agrícola (s). Esta pesquisa apresenta grande relevância técnico-científica pela exploração do potencial biotecnológico da microbiota endofítica brasileira, avaliando-se a diversidade genética e considerando-se a Inovação Tecnológica (patentes

nacionais). Além de alunos de pós-doutorado, alunos de pós-graduação inseridos no novo programa de Biotecnologia Ambiental da UEM e estudantes de Iniciação científica serão integrados ao projeto.

13.1.2 . Identificação e caracterização do problema

Devido às crescentes preocupações com a saúde e segurança ambiental, o uso de substâncias químicas tóxicas, cancerígenas, e/ou prejudiciais ao meio ambiente estão sendo desencorajadas (MCSPADDEN GARDENER & FRAVEL, 2002). Os inseticidas e fungicidas utilizados no controle de pragas e fitopatógenos eliminam também espécies importantes para o ambiente, como insetos e micro-organismos que controlam e inibem a multiplicação dos organismos prejudiciais (AZEVEDO et al., 2000).

Assim, os programas de manejo integrado de patógenos podem minimizar os custos ambientais e econômicos de seu controle, e alcançar uma produção agrícola sustentável (MCSPADDEN GARDENER & FRAVEL, 2002). Uma alternativa é o controle biológico, que se baseia em interações benéficas decorrentes de competição, antagonismo e hiperparasitismo de microrganismos contra patógenos de plantas, insetos e plantas invasoras (MATHRE et al., 1999). A habilidade dos endófitos na produção *in vitro* de substâncias que inibem o crescimento de outras espécies de micro-organismos têm estimulado as pesquisas em relação à bioprospecção de fungos endofíticos e ao controle biológico (ARNOLD, 2008).

Micro-organismos endofíticos são aqueles que vivem no interior das plantas, sem causar danos a eles (BERNARDI-WENZEL et al, 2010;. GARCIA et al, 2012a;. ORLANDELLI et al, 2012a;.. RHODEN et al, 2012a). Localizam-se na parte aérea das plantas, principalmente nas folhas, ocupando os espaços intercelulares (BERNARDI-WENZEL et al, 2010;.. GARCIA et al, 2012a), caracterizando uma relação simbiótica. A maioria dos estudos estão associados com os grupos de fungos e bactérias. A relação entre endófitos e espécies de plantas e do grau de especialização em interações podem indicar que as espécies co-evoluiram (PAMPHILE & AZEVEDO, 2002). Podem habitar o interior de um vegetal durante todo o seu ciclo de vida ou apenas uma fase de seu desenvolvimento. Ocorrem principalmente, nas partes aéreas de seu hospedeiro e não causam malefícios ao vegetal – contrariamente, manifestam algumas vantagens ao hospedeiro, protegendo-o contra o ataque de insetos e moléstias, apresentando modificações fisiológicas, havendo produção de substâncias de interesse biotecnológico (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO e ARAÚJO, 2007).

Para o isolamento dos fungos endofíticos é necessário manter a microbiota interna viável e ao mesmo tempo, eliminar a microbiota epifítica, para que não sejam isolados juntamente como os endófitos. Esse processo varia de acordo com o órgão utilizado, a textura do mesmo, a idade da planta, etc. (ARAÚJO et al., 2010).

Especialmente nos últimos anos os micro-organismos endofíticos foram reconhecidos e estudados, identificados molecularmente via sequenciamento do rDNA (RHODEN et al, 2013) e por análise de múltiplos loci gênicos (POLONIO et al., 2016), graças à descoberta da capacidade dos mesmos de protegerem seu hospedeiro do ataque de insetos, patógenos e herbívoros domésticos, possuindo capacidade de produzir alterações fisiológicas nos vegetais que os albergam, sendo responsáveis pela produção de fármacos como antibióticos e antifúngicos, antitumorais e promovendo o crescimento da planta (AZEVEDO, 1999; AZEVEDO et al., 2000, AZEVEDO e ARAÚJO, 2007; ORLANDELLI et al., 2017). Os micro-organismos endofíticos produzem uma ampla diversidade de metabólitos secundários bioativos de estrutura única, incluindo alcalóides, benzopiranonas, quinonas, flavonóides, ácidos fenólicos, esteróides, terpenóides, tetralonas, xantonas entre outras. Uma revisão realizada por Newman e Gragg (2007), apontou que um número significativo de compostos bioativos são produzidos por micro-organismos e/ou endófitos que podem servir de fonte para o desenvolvimento de novas drogas. Os compostos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos têm apresentado resultados promissores na área da saúde, e vários trabalhos apontam seu potencial como antimicrobiano, antioxidante, anticâncer, antidiabético, imunossupressor, inibidor de acetilcolinesterase, entre outras propriedades (GUNATILAKA, 2006; YU et al., 2010; JOSEPH et al., 2011; GARCIA et al., *2012b;* ORLANDELLI et al.,2012b; RHODEN et al.,2012b).

As características botânicas e propriedades medicinais de diversas plantas tem sido mostrado em diferentes publicações e podem estar relacionadas com os metabólitos que são produzidos por micro-organismos endofíticos (GARCEZ et al., 1996; NAVICKIENEET al., 2000; ALBIERO et al., 2001; TANAKA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2007).

13.1.2.1. Antagonismo entre micro-organismos endofíticos e fungos fitopatogênicos:

O fenômeno de antagonismo entre micro-organismos refere-se à capacidade da microbiota normal (p.ex. endófitos) em competir com organismos patogênicos e, em algumas circunstâncias, combater seu crescimento eficazmente, diminuindo seus nutrientes ou produzindo alguma substância desfavorável aos mesmos. Interações antagonísticas entre os microrganismos na natureza, incluindo a antibiose, a competição e o parasitismo, servem de mecanismos básicos pelos quais os agentes de biocontrole atuam (VALADARES-INGLIS et al., 2002).

Araújo et al., (2002), relacionam a dinâmica da interação planta-patógeno-endófito com o desenvolvimento de estratégias de controle do patógeno. Para isso, é necessário o conhecimento da comunidade endofítica associada ao hospedeiro de interesse, dos processos de patogenicidade e das possíveis interações do patógeno alvo com esses endófitos, que estão vivendo em harmonia com a planta hospedeira. Porém, se ocorrer um desequilíbrio na população de endófitos pode ocorrer o estabelecimento de patógenos.

Os micro-organismos podem atuar direta ou indiretamente sobre os patógenos, inibindo o seu desenvolvimento. As principais estratégias utilizadas pelos endófitos são: competição por espaço e nutrientes; o antagonismo, onde o fungo produz compostos contra o patógeno e desenvolvimento de uma barreria física feita pelo fungo endofítico que coloniza interna e externamente os tecidos da planta hospedeira, impedindo assim o acesso do patógeno; produção de enzimas hidrolíticas que degradam as células dos micro-organismos patogênicos, reduzindo assim sua variabilidade e indução de resistência sistêmica, que podem levar a planta a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno, ou alterar a morfologia do vegetal (MACCHERONI et al., 2004). Em alguns casos, o controle é indireto e o endofítico produz metabólitos que retardam o desenvolvimento do patógeno (AZEVEDO et al., 2002).

Silva eta al. (2016), isolaram bactérias endofíticas de sementes de Paulinia cupana (Guaraná) da região do Amazonas e nordeste da Bahia, uma região onde esta doença não é um problema para as plantações de guaraná. Cento e duas bactérias foram avaliadas in vitro contra a linhagem fitopatogênica de Colletotricum gloeosporioides L1. Aproximadamente, 15% dos isolados apresentaram elevada atividade antagonista contra o fitopatógeno. A maioria desses isolados foram originados da região afetada por antracnose.

Felber et al. (2016) bioprospectaram endófitos de *Vitis labrusca* L. (Vitaceae), importante espécie de uva utilizada

na preparação de sucos e vinhos, e altamente resistente às doenças de fungos. Foram isolados fungos endofíticos de folhas das cultivares Bordô e Concord (*V. labrusca* L.), que foram ordenados em 68 e 62 grupos de morfo das cultivares Bordô e Concord, respectivamente. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para confirmar a presença de endófitos nas folhas. A diversidade endofítica foi analisada com base no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, permitindo a identificação de fungos pertencentes a diferentes gêneros, incluindo *Cochliobolus*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Phoma* e *Phomopsis*. O potencial biotecnológico dos endófitos foi testado in vitro para o controle de fungos patogênicos de videiras, incluindo *Alternaria* sp., *Sphaceloma* sp. e *Glomerella* sp. As percentagens de inibição acima de 50%, como demonstrado por alguns isolados, indica seu potencial de controle biológico.

Bongiorno et al (2016) isolaram fungos endofíticos de uma variedade orgânica de *Coffea arabica* L. cultivar IAPAR-59. As análises demonstraram uma diversidade de gêneros, incluindo: *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Schizophyllum*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium* e *Cercospora*, bem como o primeiro registro do gênero *Ophiognomonia* em *C. arabica*. Nos testes de atividade antagonista, os endófitos apresentaram atividade de inibição do crescimento contra os fitopatógenos *Glomerella* sp., *Colletotrichum* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*. Similarmente, Specian et al (2016) avaliaram o potencial biotecnológico de bactérias endofíticas isoladas de acerola (*Malpighia emarginata*) contra diferentes fungos fitopatogênicos tais como *Moniliophthora pemiciosa*, *Fusarium solani*, *Dydmella bryoniae* e *Glomerella* sp. Das bactérias analisadas, 92.30% demonstraram atividade antagonista contra fungos fitopatogênicos. Além disso, 12,82% inibiram o crescimento de todos os fungos analisados, especialmente o endófito G8O43 (A) (*Bacillus* sp), que apresentou o índice de inibição mais alto para quatro dos sete fitopatógenos estudados (*Glomerella* sp, *F. solani*, *Alternaria* sp e *F . oxysporum*). No entanto, 7,69% não possuiram atividade antagonista.

13.1.2.2. Identificação dos isolados microbianos

Rhoden *et al.* (2012a; 2013), demonstraram que a amplificação da região espaçadora transcrita (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal (rDNA) pela reação da polimerase em cadeia (PCR), com o sequenciamento e análise da similaridade entre as sequências obtidas e aquelas depositadas em bancos de dados, é muito empregada para a identificação de espécies de fungos. O DNA ribossomal está presente em todos os organismos e a sua evolução é rápida, portanto, é apropriado para discriminar espécies relacionadas, ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. As regiões ITS são flanqueadas por segmentos conservados (genes 18S, 5.8S e 28S). Estas regiões conservadas fornecem informação sobre a filogenia e o nível taxonômico, uma vez que, a sua evolução é lenta e são altamente semelhantes dentro de diferentes táxons, enquanto que as regiões variáveis, os ITS, apresentam muitas mutações durante o processo de evolução, podendo ser mais utilizadas para a classificação intraespecífica (FUNGARO, 2000). Por outro lado, o agregado gênico do rDNA em bactérias 16S, ITS, 23S e 5S (ARAÚJO et al, 2010) pode ser empregado na identificação de bactérias endofíticas. Contudo, a utilização apenas da região espaçadora transcrita do rDNA tem sido insuficiente para a determinação da espécie, muitas vezes podendo precipitadamente gerar uma identificação errônea, principalmente em fungos. Atualmente tem-se utilizado diferentes genes ou loci concatenados numa análise multilocus, como os genes da β-tubulina, fator de elongação da tradução 1α (EF-1α) e calmodulina, o que possibilita uma identificação e análise filogenética mais robusta e confiável a nível de espécie em fungos (GOMES et al., 2013; ROKAS et al., 2003; POLONIO et al., 2016; SANTOS et al., 2016,).

13.1.2.3. Micro-organismos promotores do crescimento em plantas / inoculantes microbianos

Não só no âmbito de biocontrole, as bactérias endofíticas também se destacam como reguladores de crescimento vegetal. De acordo com Lira-Cadete et al. (2012), alguns micro-organismos, principalmente as bactérias, apresentam a capacidade de se associar às plantas e estimular o desenvolvimento destas e, portanto, torna-se importante a bioprospecção de isolados bacterianos com potencial para promover o desenvolvimento vegetal. Sendo assim, sobressaem-se as bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico e fixadoras de nitrogênio. O emprego de inoculantes compostos por micro-organismos endofíticos, como bactérias e fungos, são importantes ferramentas para favorecer o desenvolvimento de culturas de importância agronômica, contribuindo para o aumento da produtividade das mesmas, além de melhorar a qualidade dos solos, reduzindo os custos e a quantidade de adubos nitrogenados, visando a preservação ambiental. Trabalhos com inoculantes produzidos a partir de bactérias fixadoras de nitrogênio tem buscado avaliar sua contribuição na eficiência do crescimento vegetal e ganho de produtividade, sobretudo quando somado a isso, essas bactérias ainda apresentam atividade biológica no controle de fitopatógenos ou resistência a outro tipo de estresse (ASSUMPÇÃO et al., 2009; BARRETTI et al., 2008; BIANCHET, et al., 2013; COMPANT et al., 2016; KONG, et al., 2017).

No Laboratório de Biotecnologia Microbiana da UEM, trabalhos recentes selecionaram diversos endófitos com a capacidade promotora do crescimento em plantas. Bulla (2017) avaliou a diversidade genética de bactérias isoladas de *Mikania glomerata* (guaco) e selecionou os isolados que possuiam potencial biotecnológico aplicado à agricultura. Foram isolados bactérias de folhas saudáveis de *M. glomerata*, e identificadas por meio do DNA genômico via sequenciamento do gene 16S rRNA, seguida da análise filogenética. O isolamento resultou em 119 linhagens de bactérias endofíticas e a análise filogenética possibilitou a identificação de 27 linhagens bacterianas distribuídas em 4 filos. Das 109 bactérias endofíticas isoladas, 34 apresentaram atividade solubilizadora de fosfato e 53 deram resultado positivo no teste de fixação biológica de nitrogênio.

Santos (2017) avaliou fungos endofíticos associados a *Justicia brandegeana* Wash. & Smith com atividade promotora do crescimento em tomate e protetora contra o causador de murcha *Fusarium oxysporum*. Três isolados fúngicos endofíticos (JB224.g1, JB252.g1 e JB270) foram utilizados por apresentarem a capacidade de inibir o crescimento de *F. oxysporum in vitro*. Demonstraram ser capazes de solubilizar fosfato de cálcio, produzir AIA e crescer em diferentes faixas de pH em meio BDA. As plantas inoculadas com os endófitos e com os endófitos e patógeno, não demonstraram alteração na biomassa vegetal, entretanto, o índice de SPAD como medida indireta de clorofila nas folhas, teve valores mais altos nas plantas inoculadas com os fungos endofíticos empregados neste estudo. Santos (2017) destacou o isolado JB270 que, além de inibir os sintomas de murcha do patógeno nas plantas de tomate, também resultou em um maior índice de velocidade de emergência de sementes de tomate, em relação à testemunha.

13.2 OBJETO DO PROJETO

*(O **Objeto** é a ação macro que se quer alcançar no projeto).*

Seleção de novos inoculantes microbianos agrícolas com atividade fitossanitária e / ou promotora do crescimento de culturas de interesse do Paraná.

13.3 METAS A SEREM ATINGIDAS

*(As **Metas** são as ações fracionadas, para se alcançar o Objeto do Projeto).*

1.Isolamento, identificação molecular (DNA barcode) e caracterização de fungos e bactérias endofíticos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da UEM com potencial biotecnológico;
2.Análise Qualitativa de endófitos potenciais promotores de crescimento em plantas (AIA, solubilização do fosfato e fixação biológica do nitrogênio);
3.Seleção de endófitos produtores de compostos bioativos;
4. Caracterização química parcial dos compostos bioativos.
5. Testes em casa de vegetação.
6. Preparação de artigos científicos, relatório e patentes.

13.4 PLANO DE TRABALHO SINTÉTICO DO PROJETO

Cronograma de Atividades

Descrição das Atividades			Indicador físico		Previsão de Execução do Objeto (meses)		% Meta no projeto	Total (R$)	% Financeiro
Nº	Metas a serem atingidas	Etapa de Execução	Unidade	Qtde.	Início*	Término*			
1	Isolamento, identificação molecular (DNA barcode) e caracterização de fungos e bactérias endofíticos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da UEM com potencial biotecnológico;	1.1. Isolamento de endófitos	endófito	100	1	9	35	20.000,00	45
		1.2. identificação molecular (DNA barcode) e caracterização de fungos e bactérias endofíticos	identificação	100	5	17		25.000,00	
2	Análise Qualitativa de endófitos potenciais promotores de crescimento em plantas (AIA, solubilização do fosfato e fixação biológica do nitrogênio	2.1. Análise Qualitativa de endófitos potenciais promotores de crescimento em plantas (AIA, solubilização do fosfato e fixação biológica do nitrogênio)	Análise de endófito	100	9	14	20	5.000,00	10
		2.2. Testes em casa de vegetação	Teste de endófitos	5	13	16		5.000,00	
3	Seleção de endófitos produtores de compostos bioativos	3.1.Avaliação qualitativa de antagonismo	Avaliação de endófito	100	1	9	25	5.000,00	35
		3.2. Obtenção e avaliação de extratos brutos de compostos orgânicos	Extrato e composto orgânico	10	12	17		25.000,00	
		3.3.Avaliação da atividade biológica de extratos e compostos orgânicos	Avaliação	50	16	21		5.000,00	
4	Caracterização química parcial dos compostos bioativos	4.1.Caracterização química	Caracterização química	5	18	32	10	10.000,00	10
5	Testes em casa de vegetação	5.1.Avaliação em casa de vegetação	Avaliação in vivo	5	22	33	5	-	
6	Preparação de artigos científicos, relatório e patentes.	6.1.Produção científica	Artigos	5	31	36	5	-	
TOTAL – Início e Conclusão do Objeto					1	36	100%	**100.000,00**	100%

* Considerar Mês 01 o primeiro mês da execução do projeto.

Mauro Luciano Baesso
Reitor

João Alencar Pamphile
Coordenador do Projeto

SETI PTG Fl. 08

SEI/
PTG
Fl.: 10
Rubrica

13.5 PLANO DE APLICAÇÃO

Disponível em documento denominado "ANEXO 1 – PLANO DE APLICAÇÃO" deste Plano de Trabalho.

13.6 CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO

Disponível em documento denominado "ANEXO 1 – PLANO DE APLICAÇÃO - Cronograma de Desembolso" deste Plano de Trabalho.

13.7 CONCLUSÃO DAS ETAPAS PROGRAMADAS

Disponível no Quadro PLANO DE TRABALHO SINTÉTICO DO PROJETO - Cronograma de Atividades, Coluna Fim de cada Etapa.

13.8 PÚBLICO ALVO

(Mencionar de forma sucinta os beneficiários do projeto).

O presente projeto visa atingir os seguintes públicos-alvo da região metropolitana de Maringá, e demais regiões do Paraná. Agricultores e cooperativas agrícolas; empresas do setor agropecuário; Novas Empresas de Biotecnologia.
A população e o meio ambiente do Paraná. Em 2002, segundo a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE -, a população paranaense era de 9.798.006 habitantes, com uma distribuição espacial estimada de 81, 41% na área urbana e 18,59% no meio rural. O Paraná possui quase 16 milhões de hectares em terras utilizáveis para agropecuária, dos quais 5,1 milhões de hectares são aproveitados em lavouras permanentes e temporárias, 6,6 milhões de hectares em pastagens naturais e artificiais, 2,7 milhões de hectares em matas naturais e plantadas e, por último, 650 mil hectares em lavouras em descanso e terras produtivas não utilizadas, de acordo com dados do último censo agropecuário do IBGE, de 1995-1996

13.9 METODOLOGIA PARA EXECUÇÃO DO PROJETO

(Explicar os procedimentos necessários para a execução do projeto destacando o método, ou seja, a explicação do delineamento do estudo, amostra, procedimentos para a coleta de dados, bem como, o plano para a análise de dados).

13.9.1. Material biológico

Micro-organismos endofíticos, fungos ou bactérias, isolados de plantas medicinais, como *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini), *Trichilia elegans* A. *juss*, *Sapindus saponaria* L., *Piper hispidum* Swartz, *Malpighia emarginata*, *Saccharum* sp., *Coffea arabica L. cv.* IAPAR-59, *Morus nigra*, *Vitis labrusca* L., ou de outras plantas de importância agronômica, pertencentes ao estoque do Laboratório de Biotecnologia Microbiana da UEM.

13.9.2. Extração e amplificação do DNA e análise filogenética de fungos endofíticos.

A extração de DNA de fungos endofíticos será feita de acordo com POLONIO, et al.(2016). Os iniciadores oligonucleotídicos utilizados para a amplificação de diferentes genes ou loci dos fungos endófitos, juntamente com os protocolos de PCR, são apresentados na Tabela 1.

Tabela1: Os genes/loci utilizados na análise de multi-locus de fungos endofíticos com os respectivos oligonucleótidos iniciadores e as condições de amplificação por PCR.

Gene/loci	Primers	Sequência (5'→3')	Condições de amplificação
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	92 °C: 4 min; (92° C 40s, 52 °C, 1 min e 30s, 72° C, 2 min) x 35 ciclos; 72 °C, 5 min
	ITS4	TCCCCGCTTATTGATATGC	
EF 1-α	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	94 °C: 4 min; (94° C 1 min, 55 °C, 1 min, 72° C, 1 min) x 40 ciclos; 72°C, 3 min
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	
TUB	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	94 °C: 4 min; (94° C 1 min, 55 °C, 1 min, 72° C, 1 min) x 40 ciclos; 72°C, 3 min
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTT GGC	
CAL	CAL228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTC CC	94 °C: 4 min; (94° C 1 min, 55 °C, 1 min, 72° C, 1 min) x 40 ciclos; 72°C, 3 min
	CAL737R	CATCTTTCTGGCCATCATGG	

Os produtos de PCR serão analisados em gel de agarose 1,5%, sendo posteriormente sequenciados utilizando o equipamento ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os resultados de sequenciamentos serão avaliados utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.2.

As sequências serão comparadas com outras depositadas no GenBank, restringindo a busca à sequências tipo (*type strains*). Após a obtenção da espécie mais similar, serão selecionadas outras espécies com maior similaridade baseado em dados filogenéticos disponíveis no banco TreeBASE. As sequências serão então resgatadas e alinhadas usando a interface online MAFFT (KATOH; TOH 2008; http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/). Após o alinhamento, será realizada a análise filogenética das sequências separadamente e concatenadas. A montagem multigênica das sequências será realizada utilizando o software SequenceMatrix (VAIDYA; LOHMAN; MEIER., 2011; http://gaurav.github.io/taxondna/).

Para a análise filogenética baseada na Máxima Verossimilhança e inferência Bayesiana, será utilizado o software MrModelTest v. 2.3 (NYLANDER, 2004) para a escolha do melhor modelo evolucionário. O software MrBayes v. 3.2.5 (RONQUIST et al., 2012) será utilizado para gerar a árvore filogenética, considerando os parâmetros gerados pelo MrModelTest, com MCMC (Markov Chain Monte Carlo) durando até o desvio padrão médio das frequências chegar abaixo de 0.01. A árvore será editada utilizando o software FigTree v. 1.4.2 (RAMBAUT, 2009).

13.9.3. Amplificação do DNA e análise filogenética de bactérias endofíticas

A extração de DNA bacteriano será realizado de acordo com Rhoden et al (2015).

A amplificação do gene 16S RNAr será realizada de acordo com Procópio et al. (2009), modificado. A reação de PCR será realizada com 5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8.4 - 500 mM de KCl, concentrada 1x), 5 µL de dNTP (2.5 mM), 3µL de cada primer (Invitrogen 10 pMol) (R1378: 5'- GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3 e PO27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 '), 0.4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/mL), 3.75 µL de MgCl2 (50 mM), 27.85 µL de água mili- Q autoclavada e 2 µL da amostra do DNA previamente extraído (10-20 ng.mL-1). As condições de PCR serão: desnaturação inicial a 94 °C durante 4 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s, anelamento a 63 °C durante 1 min, extensão a 72 °C durante 1 min e extensão final a 72 °C durante 7 min. A PCR será realizada em um termociclador modelo Speed cycler 2 analytik (AG) jena. A purificação dos produtos de amplificação será realizada com a combinação das enzimas Shrimp Alkaline Phosphate (SAP) e a Exonuclease I (EXO), adicionadas na seguinte proporção: 8 µL do produto da PCR; 0,5 µL de Exonuclease I (10 U/µL), 1 µL de Shrimp Alkaline Phophatase (1 U/µL). A reação será incubada em termociclador por 1 hora à 37°C, seguida por 15 min à 80°C, e posteriormente conservada à 4°C.

As amostras serão sequenciadas a partir dos produtos de PCR utilizando o equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. As sequências obtidas serão avaliadas quanto à sua qualidade utilizando o software BioEdit v7.2.5. As mesmas serão então submetidas para análise de quimerismo utilizando o DECIPHER Find Chimeras web tool (WRIGHT et al., 2012; http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html).

Para a identificação dos isolados, as sequências nucleotidicas encontradas serão comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information Website) utilizando a ferramenta

BLASTn aplicando-se o 'sequences from type materials' para maior robustez dos dados. A identificação será determinada baseando-se no melhor valor obtido quanto à similaridade.

Para a análise filogenética as sequências do banco de dados que apresentarem alta similaridade com as sequências obtidas, serão então resgatadas e alinhadas utilizando o ClustalW no software MEGA (versão 6.05) juntamente com as sequências dos isolados. A árvore filogenética será construída com grupamento pelo método *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), usando *p-distance* para nucleotídeos com a opção "*the pairwise gap deletion*" e bootstrap com 10.000 repetições.

13.9.4. Identificação de micro-organismos endofíticos promotores de crescimento em plantas

13.9.4.1. Seleção de bactérias para a fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Para a detecção de fixação biológica de nitrogênio serão utilizados tubos de ensaio contendo meio Nfb semi-sólido, sem nitrogênio (5,0 $g.L^{-1}$ Ácido málico; 0,5 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4; 0,2 $g.L^{-1}$ $MgSO_47H_2O$; 0,1 $g.L^{-1}$ NaCl; 0,02 $g.L^{-1}$ $CaCl_2.2H_2O$; 2mL solução de micronutrientes; 2mL solução de azul bromotimol; 4mL 4M FeEDTA; 1mL solução de vitaminas, 4,5 $g.L^{-1}$ KOH, 1,8 $g.L^{-1}$ Ágar, 1000mL de água destilada, pH 6,8). As bactérias serão inoculadas em triplicata a partir de culturas já crescidas em TSA e introduzidas até o meio do tubo. Serão incubadas a 28°C por 72 horas.

Após esse período será verificado o aparecimento de uma película de crescimento próxima à superfície dos tubos, indicando a capacidade de fixar nitrogênio (BODDEY et al., 1995).

13.9.4.2. Avaliação Qualitativa da Produção de AIA

A produção de AIA será quantificada pelo método modificado de Bric et al. (1991). As bactérias serão inoculadas em meio de cultura TSB 10%, suplementado com L-triptofano (5mM), e incubadas sob agitação no escuro a 28°C por 72 horas. As culturas serão centrifugadas (5 min a 10.000 g), e 900 µL do sobrenadante será misturado com 400 µL do reagente de Salkoviski (BRIC et al., 1991). Depois de 30 minutos de incubação, à temperatura e luminosidade ambientes, procede-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm, normalizada por meio de curva-padrão com diferentes concentrações definidas de AIA comercial.

13.9.4.3. Avaliação da solubilização de fosfato inorgânico pelas bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas serão avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato inorgânico *in vitro*. Os isolados endofíticos serão crescidos em microtubos, contendo 1,5mL de meio TSB (Caldo Triptona Soja – HIMEDIA) por 48h a 28 °C. Após esse período as bactérias serão agitadas em vortéx e eluídas em 5mL de solução salina 1% para atingir a concentração de 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (CFU/mL), o que corresponde a 0,5 na escala McFarland.

Alíquotas de 2uL da cultura bacteriana serão transferidas para quatro pontos na placa de Petri, contendo meio de fosfato insolúvel de acordo com Verma, Ladma e Tripathi (2001) modificado (10 g.L-1 glicose; 5 g.L-1 NH4Cl; 1 g.L-1 MgSO47H20; 0,8 g.L-1 CaHPO4; 15 g.L-1 ágar; pH 7,2). As placas serão incubadas a 28°C por 5 dias. Após esse período será possível visualizar a presença de halos claros ao redor das colônias capazes de solubilizar fosfato.

Para a análise estatística do teste, será realizado experimento com delineamento inteiramente casualizado, analisado estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$) com auxílio do programa estatístico Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011).

13.9.5. Identificação de micro-organismos produtores de antimicrobianos

13.9.5.1. Seleção de bactérias endofíticas com atividade antagonista

O teste será realizado por meio da inoculação de um disco de 6 mm de diâmetro de colônias dos fitopatógenos, crescidas durante 7 dias, no centro da placa de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar). Em seguida, será feito uma estria das bactérias endofíticas, previamente crescidas em meio TSB (Trypticase Soy Broth), por 24 horas, em cada lado da placa a uma distância de dois centímetros e meio do fitopatógeno. Para o controle, será inoculado somente o fitopatógeno. Todos os testes serão realizados em triplicata. As placas serão incubadas à 28°C por 7 dias. O índice de inibição será avaliado aferindo-se a área de crescimento micelial do fitopatógeno com auxílio do software ImageJ v 1.46r, de acordo com Polonio et al. (2015).

Para o índice de inibição percentual será realizado o cálculo: Im% = (1-MT/MC)×100, onde Im% = Índice de inibição em porcentagem do crescimento, MT = Média da área da triplicata aferida para o tratamento em cm^2, e MC = Média da área da triplicata aferida para o controle em cm^2. As médias de crescimento micelial dos fitopatógenos serão comparadas com os controles de cada tratamento pelo teste de Skott-Knott ($p>0,05$) com auxílio do software estatístico Sisvar 5.3.

13.9.5.2. Seleção de fungos endofíticos com atividade antagonista

Para a avaliação da atividade antagonista in vitro dos fungos endofíticos contra os fitopatógenos foi realizada a técnica de cultura pareada (CAMPANILE et al., 2007) com modificações. Discos de 6mm de diâmetro de colônias crescidas durante 7 dias dos isolados endofíticos e do fitopatógeno, foram inoculados em polos opostos de placas de Petri, contendo meio batata dextrose e ágar (BDA), à distância de 4 cm, e incubadas à 28°C por 7 dias. Os testes foram realizados em triplicata, assim como o controle negativo sem o fungo endofítico. As interações competitivas entre endófitos e fitopatógeno foram analisadas de acordo com três tipos de interações: A, B e C, propostas por (BADALYAN et al., 2002).O índice de inibição (Im%) foi avaliado pela aferição de área do crescimento micelial do fitopatógeno, utilizando o software ImageJ (v 1.46r), em comparação com a área do controle, de acordo com a fórmula: Im%= (1-MT/MC)x 100, onde Im%= Índice de inibição do crescimento micelial em porcentagem, MT=Média da área da triplicata aferida para o tratamento em cm^2, e MC= Média da área da triplicata aferida para o controle em cm^2. As médias de crescimento micelial do fitopatógeno contra o endófito foram comparadas com os controles de cada tratamento pelo teste Scott-Knott ($p>0,05$) visando evitar a ambiguidade de grupos estatísticos, com auxílio do software estatístico Sisvar 5.3.

13.9.6. Extração de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários serão obtidos de acordo com Polonio et al (2016), resultando em um extrato concentrado de acetato de etila

13.9.7. Caracterização química dos compostos presentes no extrato de metabólitos do endófitos

As cromatografias em coluna (CC) serão realizadas em colunas de vidro, utilizando-se sílica gel 60 (0, 063 – 0,200 mm) da Merck como fase estacionária. As dimensões da coluna irão depender da quantidade do material cromatografado. As eluições serão feitas com solventes orgânicos destilados e de grau P. A (hexano, diclorometano, acetato de etila (EtOAc) e metanol, na forma pura ou em misturas binárias e ordem crescente e decrescente de polaridade. As frações coletadas serão concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Para a cromatografia em camada delgada, será utilizado placas de vidro de 5,0 x 20,0 cm, preparadas com SiO_2 gel 60 G e 60 GF_{254} (Aldrich ou Merck) suspensa em água destilada numa proporção de 1:2, e distribuída em uma espessura de aproximadamente 0,25 mm.

Para a revelação das placas cromatográficas será utilizado irradiação com lâmpada UV nos comprimentos de onda 254 – 366 nm, marca Desaga modelo Abnehmbar UV (254/366 nm) e a pulverização com reveladores químicos específicos e universais preparados em soluções de ácido acético/H_2SO_4/anisaldeído para terpenos, ácido sulfúrico/metanol 1:1 e vapores de iodo seguido de aquecimento.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C serão obtidos em espectrômetro marca Varian, Mercury Plus – 300 MHz e Bruker AVANCE III HD – 300 e 500 MHz, utilizando CD_3OD, $CDCl_3$ e D_2O como solventes e TMS (δ = 0,0 ppm) como referência interna. A interpretação dos dados será confirmada por dados espectroscópicos de correlações bidimensionais COSY, HSQC, NOESY e HMBC.

As análises de LC-MS/MS serão realizadas em cromatógrafo líquido Waters acoplado ao espectrômetro Quattro micro API Waters (Beverly, EUA) com fonte de electrospray e o software de aquisição utilizado foi MassLynx (Waters, Milford, USA), utilizando uma coluna Waters Symmetry® C18 (4,6 x 75 mm x 3,6 µm). As condições de operação do espectrômetro de massas serão especificas de cada analises variando tensão capilar (modo de ionização positivo e negativo), voltagem do cone, A temperatura de fonte de gás e a temperatura de dessolvatação, fluxo de gás e fluxo de gás cone de dessolvatação. Os espectros serão registrados em modo positivo e negativo.

Os dados cromatográficos e espectroscópicos obtidos dos extratos e frações de metabólitos secundários serão comparados com dados já publicados e catalogados para fins de identificação e quimiotaxonomia das linhagens endofíticas. Serão realizados levantamentos específicos quanto à diversidade química de compostos produzidos por fungos endofíticos e outros filogeneticamente próximos para avaliar a especificidade do metabolismo secundário destas linhagens endofíticas.

13.9.8. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antifúngica e antimicrobiana será testada utilizando ensaios biológicos qualitativos, em triplicata. Os micro-organismos utilizados no teste serão fungos fitopatogênicos como *Alternaria alternata, Colletotrichum* sp., *Crinipellis perniciosa , Fusarium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas* sp.

Para a análise antimicrobiana será realizada a técnica de difusão em disco (*pour plate*) a partir da obtenção do extrato metabólito dos isolados endofíticos. A atividade antimicrobiana será avaliada pela formação do halo de inibição de acordo com Souza et al. (2004). Para controle positivo será utilizado o antibiótico Tetraciclina (Sigma) (50 $\mu g.mL^{-1}$ em etanol absoluto) ou fungicidas usados comercialmente de acordo com a cultura alvo. Alternativamente, será aplicada a técnica de citotoxicidade MTT, usando microplacas de 96 poços e leitura em espectrofotômetro monocromador para quantificação do crescimento microbiano.

13.9.9. Controle de fitopatógenos

O teste de inibição dos fitopatógenos, será realizado inicialmente de acordo com Figueiredo 2006.

Todos os experimentos serão realizados utilizando-se delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 3 repetições. Para testar a eficiência dos metabólitos extraídos, serão realizadas análises estatísticas por meio do software WinBUGS et al., que procede à análise Bayesiana (Nogueira et al., 2003) assumindo-se distribuição normal por se tratar de dados de comprimento de halo de inibição.

13.9.10. Teste em casa de vegetação

As linhagens endofíticas com maior potencial para uso como inoculantes ou controladores de patógenos serão testadas em casa de vegetação, junto ao Departamento de Agronomia da UEM de acordo com Santos (2017).

13.9.11. Formulação de inoculantes agrícolas (Fase I)

As linhagens endofíticas com resultados promissores em ensaios *in vivo* para o uso como inoculantes agrícolas, para o controle de patógenos e/ou desenvolvimento vegetal, serão submetidas a ensaios iniciais para o desenvolvimento de produtos na forma de inoculantes líquidos.

Serão realizados testes iniciais das melhores condições de crescimento microbiano em biorreatores de bancada, variando-se as condições de incubação como: meio de cultura, temperatura de incubação, com ou sem agitação, fornecimento de oxigênio, controle de pH, concentração de açúcares, entre outros.

Também poderá ser avaliada a utilização de inoculantes sólidos, em turfa. A turfa utilizada será constituída inicialmente por: (em g/100g): N total (N) - 0,76; P total (P2O5) - 0,25; K solúvel em água (K2O) - 0,28; matéria orgânica total - 34,7; pH em CaCl2 0,001 M - 6,5; relação C/N - 25; umidade a 105°C - 27,5%; material retido em peneira ABNT n° 10 (2,0 mm) - 0,0%; material retido em peneira ABNT n° 50 (0,3 mm) - 2,63%; fundo de peneira - 97,37%. A turfa (250 g por saco) será acondicionada em sacos plásticos de polietileno e esterilizada em autoclave a 120°C, 1,01325 x 105 Pa, por duas horas. Antes de preparar o inoculante, será confirmado, pelo método de diluição em placas, que a turfa estava isenta de contaminantes. Após a padronização do melhor método de produção de células viáveis, será inoculado então, 80 ml de cultura por saco de polietileno com 250 g de turfa esterilizada. Após a injeção da cultura, o orifício será selado hermeticamente. Os sacos serão incubados a 28°C ± 2°C, por sete dias, até a concentração atingir 10^8 células/g de

SETI
PTG
Fl.: 44

13.14 LISTAR OS MUNICÍPIOS ABRANGIDOS PELO PROJETO

Maringá e região metropolitana (Sarandi, Marialva, Mandaguari, Paiçandu, Ângulo, Iguaraçu, Mandaguaçu, Floresta, Doutor Camargo, Itambé, Astorga, Ivatuba, Bom Sucesso, Jandaia do Sul, Cambira, Presidente Castelo Branco, Flórida, Santa Fé, Lobato, Munhoz de Mello, Floraí, Atalaia, São Jorge do Ivaí, Ourizona e Nova Esperança), totalizando 26 municípios, possui uma área territorial de 5.978.592 km² e população estimada em 764.906 habitantes (IBGE/2013).

Além desses municípios, todo a região agricultável do Paraná. De acordo com matéria publicada em 28/07/2006 na Gazeta do Povo (http://www.gazetadopovo.com.br/economia/parana-tem-pouca-area-nao-utilizada-a51wvyj8alj5qq6giajs2icsu), O Paraná possui quase 16 milhões de hectares em terras utilizáveis para agropecuária, dos quais 5,1 milhões de hectares são aproveitados em lavouras permanentes e temporárias, 6,6 milhões de hectares em pastagens naturais e artificiais, 2,7 milhões de hectares em matas naturais e plantadas e, por último, 650 mil hectares em lavouras em descanso e terras produtivas não utilizadas, de acordo com dados do último censo agropecuário do IBGE, de 1995-1996. Ainda segundo o levantamento, dos cerca de 370 mil estabelecimentos rurais existentes no estado, mais de 100 mil têm mais de 20 hectares de área, que poderiam ser afetados pelos índices de produtividade em discussão pelo governo. Dados do Ministério da Agricultura dão conta de que o Brasil ainda tem 93 milhões de hectares agricultáveis não aproveitados.

13.15 IDENTIFICAR RISCOS QUE PODERÃO PREJUDICAR O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO E SUGERIR PLANO DE CONTINGENCIAMENTO

Risco	Plano de Contingência
Não liberação de recursos	Renegociação do cronograma, vigência do projeto e de valores
Demora na aquisição de materiais e equipamentos devido a entraves burocráticos institucionais	Renegociação do cronograma, vigência do projeto e de valores
Descontinuidade na liberação dos recursos	O projeto permanecerá pausado até a liberação dos recursos
Atraso na liberação dos recursos	Início da realização dos experimentos que possam ser executados com os atuais recursos do laboratório.

14. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES SOBRE A INSTITUIÇÃO PROPONENTE.

HISTÓRICO INSTITUCIONAL

O Centro de Ciências Biológicas possuía em dezembro de 2009, 85 laboratórios, 1 biblioteca setorial, 2 anfiteatros e um museu, totalizando 3.491,60 m2. Em 2010 foi inaugurado um novo prédio (G80) contando com 3.812,56 m2. A UEM tem abrangência em 109 municípios das regiões norte e noroeste do Paraná. Está localizada no noroeste do estado do Paraná, região predominantemente de pecuária e agricultura, com indústrias alimentícias, agropecuárias, têxteis, entre outras. Em 1986, a Universidade ampliou sua abrangência regional com a criação da extensão na cidade de Cianorte. A partir de 1991 foram implantados os campi regionais de Goioerê (por meio de um convênio, entre a UEM e um consórcio intermunicipal, formado por sete municípios), de Cidade Gaúcha, de Umuarama e de Diamante do Norte. Também foram criados: a Fazenda Experimental de Iguatemi, a Base Avançada do Nupelia em Porto Rico, o Centro de Pesquisa em Agricultura de Floriano e o Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura - NUPAGRI, em Maringá, que apoiam e dão suporte às atividades de ensino, pesquisa e extensão. Em 2010 foi criado o Câmpus Regional de Ivaiporã. As atividades de pesquisa são realizadas em laboratórios e em um complexo de centrais de apoio à pesquisa situados em Maringá e nos cinco campi de extensão, além de instalações de uso múltiplo como a base avançada em Porto Rico e duas fazendas experimentais. A UEM tem procurado investir em infraestrutura, atendendo as necessidades dos diferentes grupos de pesquisa da Instituição. Em 2001, a UEM apresentou à Finep o projeto de consolidação de uma Central de Análises Avançadas de Materiais, visando ao fortalecimento das atividades de pesquisa nas áreas de Novos Materiais e Tecnologias Agroindustrial e Ambiental. Com a instalação da Central, a UEM se firma como pólo de referência de pesquisa e produção para o Estado e a região. Outra proposta aprovada pela Finep e também já implantada, é a constituição de um Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, abrangendo uma Central de Dados e uma de Microscopia. Em 2013 foi criado o Mestrado em Biotecnologia Ambiental da UEM e em 2016 foi implantado o Doutorado em Biotecnologia Ambiental. A Central de Microscopia, utilizada por pesquisadores do programa de Biotecnologia Ambiental (Mestrado e Doutorado) implantado, possuem acesso a microscopia de varredura e transmissão. Faz parte ainda da mesma, uma Central de Biologia Molecular e Genômica afeta ao Centro de Ciências Biológicas, onde está instalado o laboratório de Genoma e Proteoma, cuja estrutura é resultante do Projeto Genoma do Paraná. Contando entre outros equipamentos, de um sequenciadorde DNA, centrífuga refrigerada, termocicladores e shaker. Quanto à infraestrutura de apoio aos cursos de graduação e pós-graduação, é importante destacarmos a instalação em 2009, da Rede Wi-Fi, no câmpus sede e nas extensões, com recursos da Seti, na ordem de R$ 3 milhões. Foram instalados 315 rádios no câmpus sede e nas extensões. No câmpus sede a rede Wi-Fi abrange mais de 90% de sua área total, permitindo que usuários, professores e alunos de graduação e pós-graduação, com equipamentos e com suporte à tecnologia sem fio, possam conectar seus equipamentos à Internet.

O Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá (LBIOMIC), lotado no Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, coordenado pelo Prof. Dr. João Alencar Pamphile, possui uma quantidade significativa de fungos e bactérias isolados de plantas de interesse agronômico, que foram obtidos no decorrer

SETI
PTG
Fl.: 15
Rubrica

15. DECLARAÇÃO DE COMPROMISSO INSTITUCIONAL

TERMO DE COMPROMISSO

Na qualidade de representante legal do proponente, estou de acordo com a proposta apresentada e declaro, para todos os fins de direito, conhecer as normas ora fixadas pelo Fundo Paraná, assim como inexistir qualquer débito em mora ou situação de inadimplência com o Tesouro Nacional ou qualquer órgão ou entidade da Administração Pública Federal, Estadual e Municipal, que impeça a transferência de recursos oriundos do Fundo Paraná.

MAURO LUCIANO BAESSO
Reitor

JOÃO ALENCAR PAMPHILE
Coordenador Técnico do Projeto

MARIA HELENA AMBRÓSIO DIAS
Responsável Administrativo/Financeiro do Projeto

Assinatura do Arquiteto Responsável Pela Obra
NOME – CARGO/FUNÇÃO

MARIA REGINA DA FONSECA
Responsável pelo Controle Interno da Instituição

Assinatura do Representante Legal da Instituição Parceira
NOME – CARGO/FUNÇÃO

ANEXO 1 - PLANO DE APLICAÇÃO
QUADRO RESUMO
Unidade Gestora do Fundo Paraná - UGF

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

TÍTULO DO PROJETO: Seleção de novos inoculantes microbianos agrícolas com atividade fitossanitária e/ou promotora do crescimento de culturas de interesse do Paraná

INSTITUIÇÃO PROPONENTE: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

COORDENADOR: Prof. Dr. João Alencar Pamphile

	Elementos de Despesa		UGF	%	Rendimentos Financeiros*
1. Outras Despesas de Custeio	1.1. Diárias	3390.14.00	0	0%	0
	1.2. Passagens e despesas de locomoção	3390.33.00	0	0%	0
	1.3. Serviços de Consultoria	3390.35.00	0	0%	0
	1.4. Material de Consumo **NACIONAL**	3390.30.00	67.982	68%	0
	1.5. Material de Consumo **IMPORTADO/ USO CONTROLADO**	3390.30.00	0	0%	0
	1.6. Serviços de Terceiros - Pessoa Física	3390.36.00	0	0%	0
	1.6.1. Obrigações Tributárias e Contributivas	3390.4700	0	0%	0
	1.7. Bolsas	3390.18.00	0	0%	0
	1.7.1 Auxílio Financeiro - Bolsas	3390.18.00	0	0%	0
	1.8. Serviços de Terceiros - Pessoa Jurídica	3390.39.00	10.018	10%	0
		Subtotal Custeio	78.000	78%	0
2. Investimentos	2.1. Equipamentos e Material Permanente **NACIONAL**	4490.52.00	22.000	22%	0
	2.2. Equipamentos e Material Permanente **IMPORTADO**	4490.52.00	0	0%	0
	2.3. Obras e Instalações	4490.51.00	0	0%	0
		Subtotal Investimentos	22.000	22%	0
		Total Geral	100.000	100%	0

Atender ao disposto no ATO ADMINISTRATIVO N° 03/16/UGF de 11/11/2016 , disponível em: www.seti.pr.gov.br/fundoparaná/atosadministrativos.

** Esta coluna deverá ser preenchida, apenas por Termos de Convênios, quando da solicitação de utilização dos rendimentos da aplicação financeira.*

SETI
Fls. 16

1. Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2. Prof. Dr. João Alencar Pamphile - Coordenador Técnico do Projeto

ANEXO 1 - PLANO DE APLICAÇÃO
1. OUTRAS DESPESAS DE CUSTEIO
Unidade Gestora do Fundo Paraná - UGF

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

1.4. CUSTEIO - Material de Consumo - Nacional

Subelementos de Despesa	Ação Nº	Etapa Nº	Descrição	Instituição	Valor			Rendimentos Financeiros
					Valor Unitário (R$)	Qtde	Subtotal	
339030	1, 2, 3, 4 e 5	1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 3.3, 4.1 e	Reagentes para pesquisa (meios de cultura, solventes, enzimas, padrões, sais, ácidos, bases, reagentes para análises colorimétricas e biologia molecular, etc)	UEM	32.982	1	32.982	
339030	1, 2, 3, 4 e 5	1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 3.3, 4.1 e	Vidrarias para laboratório (provetas, colunas de fracionamento, béquers, Erlenmayers, Frascos com rosca, frascos de antibiótico, funil de separação, etc)	UEM	5.000	1	5.000	
339030	1, 2, 3, 4 e 5	1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 3.3, 4.1 e	Consumíveis descartáveis (placas de petri, tubos e microtubos de centrífuga e de PCR, ponteiras, filtros, etc)	UEM	25.000	1	25.000	
339030	2 e 5	2.2 e 5.1	Materiais para testes em casa de vegetação (vasos, substratos, sementes, adubos, etc)	UEM	5.000	1	5.000	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
						TOTAL	67.982	0

1. Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2. Prof. Dr. João Alencar Pamphile - Coordenador Técnico do Projeto

SEI / PTG
Fl. 17
Rubrica

ANEXO 1 - PLANO DE APLICAÇÃO
1. OUTRAS DESPESAS DE CUSTEIO
Unidade Gestora do Fundo Paraná - UGF

PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

1.8. CUSTEIO - Serviços de Terceiros Pessoa Jurídica

Subelementos de Despesa	Ação Nº	Etapa Nº	Descrição e Finalidade	Instituição	Valor			Rendimentos Financeiros
					Valor Unitário (R$)	Qtde	Subtotal	
339039	1	1.2.	Serviço de sequenciamento de uma amostra de DNA	UEM	22	456	10.018	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
							0	
					TOTAL		10.018	0

1. Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2. Prof. Dr. João Alencar Pamphile - Coordenador Técnico do Projeto

ANEXO 1 - PLANO DE APLICAÇÃO
2. INVESTIMENTOS
Unidade Gestora do Fundo Paraná - UGF

PARANÁ

2.1. INVESTIMENTOS - Equipamentos e Material Permanente - NACIONAL

Subelementos de Despesa	Ação Nº	Etapa Nº	Descrição e Especificação	Instituição	Valor			Rendimentos Financeiros
					Valor Unitário (R$)	Qtde	Subtotal	
449052	3	3.2	Sistema completo de rotaevaporador	UEM	22.000	1	22.000	
							0	
							0	
							0

ANEXO 1 - PLANO DE APLICAÇÃO

CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO

Unidade Gestora do Fundo Paraná - UGF

PARANA

ELEMENTOS DE DESPESA		VALOR PROJETO	*MÊS (ANO 1) 01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	TOTAL	SALDO
3390.1400	Diárias	0													0	0
3390.3300	Passagens	0													0	0
3390.3500	Consultoria	0													0	0
3390.3000	Mat. Consumo NACIONAL	67.982	67 982												67.982	0
3390.3000	Mat. Consumo IMPORTADO	0													0	0
3390.3900	ST Pessoa Física	0													0	0
3390.4700	Obrigações Tributárias e Contributivas	0													0	0
3390.1800	Bolsas	0													0	0
	Auxílio Financeiro	0													0	0
3390.3900	ST Pessoa Jurídica	10.018	10 018												10.018	0
4490.5200	Equipamentos e Mat. Permanente NACIONAL	22.000	22 000												22.000	0
4490.5200	Equipamentos e Mat. Permanente IMPORTADO	0													0	0
4490.5100	Obras e Instalações	0													0	0
TOTAL:		100.000	100.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.000	0

** Entende-se por mês 1 (um) o mês de início das atividades do projeto*

*** Definir valores a serem liberados mensalmente ao Projeto (em amarelo)*

1 Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso - Reitor

2 Prof. Dr. João Alencar Pamphile - Coordenador Técnico do

SETI PTG Fl. 26 Rubrica