

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMAZÔNICOS COM
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE AOS
FITOPATÓGENOS DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora*
Ducke)

DOUGLAS REIS SIQUEIRA

MANAUS

2011

DOUGLAS REIS SIQUEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMAZÔNICOS COM
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE AOS
FITOPATÓGENOS DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora*
Ducke)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Sayuri Maki

MANAUS

2011

DEDICATÓRIA

À minha mãe, pelo estímulo e compreensão dados durante esta trajetória e pelos ensinamentos de vida que me fizeram chegar até aqui. À minha esposa, por todo amor, carinho, paciência e incentivo que me proporcionou durante estes anos, não me deixando desistir nos momentos mais difíceis e me fazendo buscar sempre mais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado o dom da vida, a paciência, a determinação, a sabedoria e principalmente a força de vontade para conseguir alcançar todos os objetivos.

À minha família por estarem sempre ao meu lado, tanto nos momentos bons quanto nos mais difíceis, me incentivando sempre a estudar e seguir no caminho do bem, me apoiando e ajudando a buscar os objetivos com determinação e força de vontade.

À minha orientadora Prof^a. Patrícia Albuquerque por todos os ensinamentos, paciência, compreensão e incentivo dados durante esta caminhada. E ainda o mais importante, pela amizade e respeito que construímos ao longo desses anos.

A minha co-orientadora Prof^a. Cristina Maki, por ter aceitado me co-orientar e poder contribuir, com todo seu conhecimento e paciência na conquista de mais esta etapa em minha vida.

Ao professor Sérgio pela amizade construída, pela paciência e pela contribuição para a realização deste trabalho.

Ao professor Paulo de Tarso Sampaio da UEA, por ter cedido as mudas de pau-rosa para a realização deste trabalho.

Ao professor Gil Rodrigues da UFT, por ter ajudado na identificação dos fungos, o que foi de suma importância para alcançarmos o objetivo maior deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos mais do que especiais.

Aos professores Cleiton e Helena por terem me ajudado na realização da parte molecular do trabalho.

Aos meus amigos Rafael, Renah, Márcia, Dulce, Paula, Ketlen, Celina, Andrey, Andréia, Geverson e todos os outros que me deram o prazer de estudarmos juntos e poder aprender um pouco mais com cada um deles.

Ao Sandro e sua esposa Ariela pela amizade sincera que construímos nesses anos e que espero tê-la sempre. Em especial ao Sandro, pela ajuda dada, que foi de fundamental importância para a realização deste trabalho, e ainda por toda amizade e carinho.

A todos que trabalham no MBT pelo apoio e pela contribuição que deram, cada um de sua forma, durante todos esses anos. Em especial à Dolores, Barcelar, Fátima e Juce, meus agradecimentos.

RESUMO

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMAZÔNICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE AOS FITOPATÓGENOS DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke)

A espécie *Aniba rosaeodora* possui alto valor econômico, devido à constituição química do seu óleo essencial rico em linalol, encontrado em grande quantidade, principalmente no lenho e na casca. Como consequência de sua importância econômica, houve uma exploração indiscriminada dessa espécie, levando a uma erosão genética, que impediu sua regeneração natural, incluindo-a na lista de espécies ameaçadas de extinção. Dessa forma, o manejo de plantios através da poda da copa das árvores do pau-rosa pode constituir uma alternativa viável para produção de óleo a partir de galhos e folhas, tornando-se, portanto, um meio sustentável para conservação e utilização do potencial econômico desta espécie. No entanto, para garantir um manejo adequado dos plantios e alta produtividade, faz-se necessário a realização do controle fitossanitário, a fim de evitar a propagação de pragas e fungos fitopatogênicos. Tais microrganismos causam enormes prejuízos em culturas de grande importância econômica, visto que, ao infectar a planta, podem provocar necrose de tecidos, redução de crescimento, diminuição da produção e até a morte. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de fungos endofíticos isolados de *Myrcia guianensis* em produzir compostos com ação inibitória sobre os fungos fitopatogênicos isolados de pau-rosa. Os fungos endofíticos foram isolados de raiz, caule e folha de plantas coletadas no Município de Santarém-Pará. Os fungos fitopatogênicos foram isolados de mudas de pau-rosa com sintomas de mancha foliar que estavam em casa de vegetação. Foram isolados e caracterizados macro e micromorfológicamente 16 fungos fitopatogênicos. De acordo com suas características, foi possível identificar os gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Dos meios metabólicos secundários dos 40 fungos endofíticos testados frente às linhagens fitopatogênicas, 25% apresentaram resultado positivo frente a pelo menos uma linhagem. No entanto, nenhum dos metabólitos apresentou atividade frente às cepas de *Pyricularia grisea* e *Didymella bryoniae*. Os meios metabólitos que inibiram um maior número de fungos foram os obtidos de isolados endofíticos do gênero *Phomopsis* sp.. O fungo **Mg C2.3.2** inibiu cinco fungos fitopatogênicos, sendo alguns pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*; e o isolado **Mg F 3.3.1 B** inibiu o crescimento de fungos do gênero *Penicillium*. O extrato do isolado de *Penicillium* sp. (**MgC 2.3.2 B**) inibiu quatro fungos isolados do pau-rosa pertencentes aos gêneros *Fusarium* e *Cladosporium*. Foi possível ainda confirmar a patogenicidade do isolado T3/M1 09 a partir do re-isolamento do fungo M3/R2 06 de mudas de pau-rosa, e através das características micro e macromorfológicas o mesmo foi identificado como pertencente ao gênero *Fusarium*.

Palavras-chave: Lauraceae, fungos endofíticos, atividade antifúngica, *Fusarium*, Amazônia.

ABSTRACT

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF AMAZON FUNGI AGAINST ROSEWOOD (*Aniba rosaeodora* Ducke) PHYTOPATOGENS

Aniba rosaeodora presents significant economic importance due to the chemical constitution of its essential oil, rich in linalool, found mainly in the trunk and bark of the plant. As a consequence of its high economic value, there was an indiscriminate exploration of the species, leading to genetic erosion, which restrained its natural regeneration and included it in the list of species that are threatened to be extinct. Therefore, the handling of plantings by cutting the cups of rosewood trees can represent a feasible alternative for the production of oil from stem and leaves, becoming a sustainable way for the conservation and rational use of the economic potential of this species. However, in order to guarantee an adequate handling of the plantings and along with high productivity, it is necessary to have a phytosanitary control, to avoid plague and phytopathogenic fungi propagation. These microorganisms cause huge amounts of losses in important agricultural cultures, since their infections can provoke plant tissue necrosis, reduction of growing, diminishing of production, and even death. Consequently, in this work it was investigated the ability of endophytic fungi isolated from *Myrcia guianensis* to produce secondary metabolites that present inhibitory effect against phytopathogenic fungi isolated from rosewood plants. Endophytic fungi were isolated from root, stem and leaf of plants collected in Santarém, Pará. The phytopathogenic fungi were isolated from young rosewood plants cultivated in a green house which presented leaf blight as a symptom of fungal infection. Sixteen fungi were isolated and characterized according to its macro and micromorphological aspects. It was possible to identify the genres *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Aspergillus*. Of the 40 metabolic broths tested against the phytopathogenic strains, 25% presented a positive result over at least one microorganism. Nevertheless, none of the metabolites cause the growth inhibition of *Pyricularia grisea* and *Didymella bryoniae*. The secondary metabolites that inhibited a greater number of phytopathogenic fungi were obtained from endophytes of the genre *Phomopsis* sp.. The isolate **Mg C2.3.2** inhibited the growth of five phytopatogenic fungi, including those of the genres *Penicillium* e *Fusarium*, and the endophyte isolate **Mg F 3.3.1 B** inhibited the growth of *Penicillium* fungi. The methabolic broth obtained from an endophyte of the genre *Penicillium* sp. (**MgC 2.3.2 B**) inhibited four fungi isolated from rosewood plants, which belong to the genres *Fusarium* and *Cladosporium*. It was possible to confirm the pathogenicity of the isolate T3/M1 09 through the re-isolation of the strain M3/R2 06 from rosewood young plants, which was micro and macromorphological characterized as belonging to the genre *Fusarium*.

Key words: Lauraceae, endophytic fungi, antifungal activity, *Fusarium*, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Pau-rosa: <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke. (a) árvore nativa (b) mudas cultivadas em viveiro.....	15
FIGURA 2: Estrutura química do linalol, principal componente do óleo essencial produzido por <i>A. rosaeodora</i>	16
FIGURA 3: Esporos e corpos de frutificação dos principais grupos de fungos.....	19
FIGURA 4: Sintomas comuns causados por fungos mitospóricos e Ascomycetes.....	25
FIGURA 5: Sintomas da doença vassoura de bruxa no cacau.....	26
FIGURA 6: Sintomas da podridão nobre provocada pelo fungo <i>Botrytis cinerea</i>	27
FIGURA 7: Lesão causada pela doença brusone no arroz.....	28
FIGURA 8: Doença do crestamento gomoso do caule.....	28
FIGURA 9: Folhas lesionadas utilizadas para o isolamento de fitopatógenos.....	35
FIGURA 10: Em (a) mudas saudáveis de pau-rosa, (b) assepsia, (c) abrasão das folhas e (d) inoculação do fragmento fúngico.....	39
FIGURA 11: Ensaio de atividade antifúngica: em (a) halo de inibição promovido pelo meio metabólico, em (b) placa de controle negativo, em (c) halo de inibição promovido pelo meio metabólico Mg R2 2.2 e em (d) placa de controle negativo.....	42
FIGURA 12: Fungos fitopatogênicos isolados de pau-rosa.....	43
FIGURA 13: Morfologia das lesões após a inoculação dos possíveis fitopatógenos de pau-rosa em mudas de <i>A. roseaodora</i> : Controle negativo (a); lesões da muda nº 7, um dia após a inoculação (b); lesões da muda nº 8 após um dia da inoculação (c) e folhas coletadas para re-isolamento, após 21 dias da inoculação.....	44
FIGURA 14: Características macro e micromorfológicas do fungo inoculado T3/M2 05 (a) e do re-isolado M5/R2 04 (b).....	45
FIGURA 15: Características macro e micromorfológicas do fungo inoculado T3/M1 09 (a) e re-isolado M3/R1 02 (b).....	46

FIGURA 16: Características macro e micromorfológicas do fungo inoculado T4/M3 11 (a) e re-isolado M4/R2 03 (b).....	47
FIGURA 17: Características macro e micromorfológicas do fungo inoculado T3/M1 09 (a) e re-isolado M3/R2 06 (b).....	48
FIGURA 18: Isolados de <i>Fusarium</i> spp.: Isolado T3/M1 09: morfologia micelial (a); morfologia reversa (b); micromorfologia em 400X (c). Isolado T3/M2 05: morfologia micelial (d); morfologia reversa (e); micromorfologia em 400 X (f).....	50
FIGURA 19: Isolados de <i>Penicillium</i> spp.: Isolado T3/M2 20: morfologia micelial (a); morfologia reversa (b); micromorfologia em 400X (c). Isolado T4/M2 12: morfologia micelial (d); morfologia reversa (e); micromorfologia em 400X (f).....	51
FIGURA 20: Isolado de <i>Cladosporium</i> spp.: Isolado T4/M2 03: morfologia micelial (a); morfologia reversa (b); micromorfologia em 400X (c).....	52
FIGURA 21: Isolado de <i>Aspergillus</i> spp.: Isolado T4/M4 09: morfologia micelial (a); morfologia reversa (b); micromorfologia em 400X (c).....	52
FIGURA 22: Isolados T3/M2 01 (ilustrações no plano superior) e T3/M3 02 (ilustrações do plano inferior): morfologia micelial (a, d); morfologia reversa (b, e); micromorfologia em 400X, ilustrando a presença de apressório em f (c, f).....	53
FIGURA 23: Isolados T4/M2 01 (ilustrações no plano superior) e T4/M3 11 (ilustrações do plano inferior): morfologia micelial (a, d); morfologia reversa (b, e); micromorfologia em 400X, ilustrando a ausência de conídios em f (<i>Mycelia sterilia</i>) (c,f).....	53
FIGURA 24: Isolados T3/M4 04 (ilustrações no plano superior) e T3/M4 05 (ilustrações do plano inferior): morfologia micelial (a, d); morfologia reversa (b, e); micromorfologia em 400X, ilustrando a ausência de conídios (<i>Mycelia sterilia</i>) (c, f).....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sintomas comuns de doenças provocadas por fungos fitopatogênicos.....	22
TABELA 2: Isolados de fungos endofíticos de <i>M. guianensis</i> selecionados para cultivo e obtenção do meio líquido metabólico.....	37
TABELA 3 Fungos inoculados e re-isolados de mudas de pau-rosa.....	40
TABELA 4: Resultado dos testes antifúngicos realizados com o meio metabólico líquido dos fungos endofíticos isolados de <i>M. guianensis</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
BD	Batata Dextrose
BDA	Ágar Batata Dextrose
BOD	Demanda Biológica de Oxigênio
DAP	Diâmetro à altura do peito
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EST	Escola Superior de Tecnologia
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
ha	Hectare
HCl	Ácido clorídrico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
kg	Quilograma
M	Molar
MBT	Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
t	Tonelada
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
US\$	Dólar americano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 FAMÍLIA LAURACEAE	14
1.1.1 <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke: importância econômica	15
1.2 FUNGOS	18
1.2.1 Fungos Fitopatógenos	21
1.2.2 Fungos Endofíticos	29
1.3 CONTROLE BIOLÓGICO.....	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
3.1.1 Hospedeiros vegetais: <i>Aniba rosaeodora</i> e <i>Myrcia guianensis</i>	35
3.1.2 Microrganismos	35
3.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS FITOPATÓGENOS DE PAU-ROSA.....	36
3.3 INOCULAÇÃO E RE-ISOLAMENTO DOS PATÓGENOS.....	38
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS POR MACRO E MICROMORFOLOGIA.....	38
3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	39
3.6 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR ENDÓFITOS DE <i>Myrcia guianensis</i>	41
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, INOCULAÇÃO E RE-ISOLAMENTO DOS FITOPATÓGENOS DE PAU-ROSA	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS POR MACRO E MICROMORFOLOGIA.....	49
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>M. guianensis</i>	54
4.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	58
5 CONCLUSÕES	60
6 PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS	62

INTRODUÇÃO

O pau-rosa é uma espécie de grande valor econômico, devido à produção do linalol, componente majoritário do óleo obtido pela destilação das folhas, galhos, madeira e raízes, apresentando alta demanda no mercado nacional e internacional, tendo em vista seu uso como fixador na indústria de perfumes (HANDA et al., 2005). Como consequência de sua importância econômica, houve uma exploração indiscriminada dessa espécie, levando a uma erosão genética, que impediu sua regeneração natural, incluindo-a na lista de espécies ameaçadas de extinção (IBAMA, 1992).

O manejo de plantios com espécies florestais por meio de corte raso e regeneração por brotação das plantas, vem sendo praticado com sucesso para eucalipto e algumas espécies nativas da Amazônia Central. Logo, o manejo de plantios através da poda da copa das árvores do pau-rosa pode constituir uma alternativa viável para produção de óleo a partir de galhos e folhas, tornando-se, portanto, um meio sustentável para conservação e utilização do potencial econômico desta espécie (SAMPAIO et al., 2007). Entretanto, visando a melhora no manejo sustentável do plantio de rebrotas de pau-rosa e consequente aumento na produção de linalol, faz-se necessário um controle fitossanitário, para evitar a propagação de patógenos.

Os microrganismos causadores de doenças de plantas geralmente interagem com o hospedeiro, invadem seus tecidos, gerando o processo infeccioso, e ao colonizar a planta, retiram desta, todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (BATISTA et al., 2007). Fungos patogênicos de plantas causam perdas em numerosas culturas de importância econômica, como por exemplo, grãos em campos de milho infectados com espécies de *Fusarium* (HUSSEIN et al., 2002) e a diminuição da produção e morte de culturas agrícolas e árvores na Índia causadas pelo fungo *Ganoderma* (SANKARAN et al., 2005). Outro exemplo de grande importância econômica para o Brasil é cultura da soja. As doenças responsáveis pelas maiores perdas desta cultura tem sido causadas por fungos, tais como, *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, *Colletotrichum dematium* var. *truncata*, *Septoria glycines*, *Cercospora kikuchii*, *C. sojina*, *Phomopsis sojiae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e outras espécies (YORINORI, et al., 1993).

A prevenção de tais doenças tem, tradicionalmente sido alcançada por meio do uso de fungicidas químicos. No entanto, consumidores estão cada vez mais conscientes acerca da poluição química no ambiente e sobre resíduos de pesticidas nos alimentos. Além disso, produtores estão sendo mais freqüentemente defrontados com patógenos resistentes aos fungicidas disponíveis no mercado. Portanto, ambos os consumidores e produtores comprometidos com agricultura estão preocupados em encontrar uma alternativa de controle de doenças que não cause danos ao meio ambiente e ao homem.

Dentro deste contexto, podemos citar o controle biológico, o qual pode ser uma importante alternativa no manejo das doenças, em particular com a utilização de fungos endofíticos, visto que os mesmos são capazes de colonizar os tecidos do hospedeiro sem causar danos, o que faz dos endófitos uma ferramenta importante para aumentar a produtividade das plantas cultivadas e protegê-las dos inimigos naturais.

No Brasil, o controle biológico começou a ser utilizado com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e com o *Baculovirus*, no controle das cigarrinhas da cana e das pastagens, e no controle da *Anticarsia gemmatilis* na soja, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 1999; BROGLIO et al., 2006). Atualmente diversos estudos vêm sendo realizados com o uso de fungos endofíticos para o controle biológico, bem como na produção de compostos antifúngicos.

Dentro deste contexto, a prospecção química de metabólitos fúngicos apresenta-se como uma perspectiva de suma importância, pois sabe-se que microrganismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, produzindo uma série de moléculas bioativas que podem atuar no combate a patógenos (TAKAHASHI e LUCAS, 2008). Além disso, há a possibilidade de que novos compostos de valor econômico sejam descobertos, como novos antibióticos, antifúngicos, agentes terapêuticos, produtos químicos, enzimas, entre outros.

Considerando a importância econômica e ambiental da espécie *Aniba rosaeodora* Ducke e a necessidade de um controle fitossanitário adequado, utilizando-se fungicidas ambientalmente corretos, buscou-se neste trabalho contribuir na detecção de fungos endofíticos produtores de compostos ativos com atividade inibitória sobre o desenvolvimento dos possíveis fitopatógenos isolados de pau-rosa.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 FAMÍLIA LAURACEAE

O nome Lauraceae é originado do gênero *Laurus* L., que em latim significa louro. Contudo, a literatura indica que esse nome é oriundo de *laus* – louvor, em referência às coroas de louro que eram oferecidas aos heróis em louvor aos atos de bravura (ALVES e ISHII, 2007).

A família Lauraceae é considerada uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta. Apresenta-se amplamente distribuída através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo constituídas por 49 gêneros e 2,5 a 3 mil espécies. No Brasil, ocorrem 22 gêneros que habitam, em sua maior parte, as florestas pluviais e também as restingas e os cerrados (WERFF e RICHTER, 1996; QUINET, 2005).

Pertencem ao grupo de angiospermas de maior dificuldade para a caracterização de suas espécies, principalmente pela significativa uniformidade morfológica existente entre os táxons. Entretanto, estudos anatômicos de folhas, frutos e lenhos de espécies de Lauraceae têm apoiado os estudos taxonômicos do grupo, atuando como uma ferramenta adicional na identificação de táxons (COUTINHO et al., 2006).

A importância do estudo desta família está relacionada principalmente a dois aspectos. Primeiro, pela representatividade, tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons, apontada em inventários florísticos e fitossociológicos realizados em áreas de florestas bem preservadas da porção sudeste-sul do país, fato este que corrobora a hipótese de que a Floresta Atlântica seja um dos principais centros de diversidade deste grupo. E segundo, pela sua importância econômica, visto que muitas espécies têm sido utilizadas na culinária, em marcenaria e na construção civil, na fabricação de papel, na indústria de perfumaria, na indústria química e na medicina popular. Porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001; KROPF et al., 2006).

Dentre os principais gêneros de lauráceas, podemos citar *Ocotea* Aubl, utilizado para a fabricação de caixotes, obras internas e carpintaria; *Nectandra* Rol. ex Rottb., *Licaria* Aubl., cujos gêneros revelam a presença de compostos químicos denominados

neolignan, presentes nos extratos das plantas e relacionados à atividade antitumoral. *Persea cordata* (Vell.) Mez é uma espécie da flora catarinense, que apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*; e *Aniba*, gênero de destacado valor comercial devido à produção de óleo essencial (MARQUES, 2001).

1.1.1 *Aniba rosaeodora* Ducke: importância econômica

O gênero *Aniba* pertence à família Lauraceae, sendo constituído por 41 espécies neotropicais, das quais 27 estão distribuídas em território brasileiro (MABBERLEY, 1990). As espécies do gênero *Aniba* merecem destaque pelo alto valor econômico, devido à constituição química de um óleo essencial, encontrado em grande quantidade, principalmente no lenho e na casca. Em 1881, Morim purificou o óleo essencial e o chamou de linalol (MARQUES, 2001).

Um das espécies mais conhecidas deste gênero é *Aniba rosaeodora*, conhecida popularmente como pau-rosa (Figura 1). Desta espécie é extraído o linalol, principal constituinte de seu óleo essencial usado como fixador na fabricação de cosméticos, perfumes caseiros, sprays para aromatizar ambientes e em loções para reumatismo, tendo o óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) como complemento (LUPE, 2007).



Figura 1. Pau-rosa: *Aniba rosaeodora* Ducke. (a) árvore nativa (b) mudas cultivadas em viveiro.

O linalol, cuja estrutura química está ilustrada na Figura 2, é um monoterpene alcoólico terciário de cadeia aberta, aplicado com sucesso como sedativo e anticonvulsivo, e que também possui propriedades acaricidas, bactericidas e fungicidas já descritas. Uma

das características que influencia o valor comercial dos óleos que produz, é a presença de um estereocentro na sua estrutura, possuindo dois estereoisômeros: coriandrol e licareol. A quantidade destes dois isômeros influencia não somente o aroma, mas também nas suas atividades farmacológicas. Esse álcool é também um importante intermediário na produção de vitamina E (OHASHI, 1997; ALCÂNTARA et al., 2010).

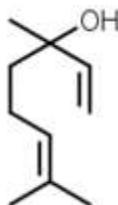


Figura 2. Estrutura química do linalol, principal componente do óleo essencial produzido por *A. rosaeodora*.

Análises do óleo essencial de *A. rosaeodora* indicaram alta concentração de linalol extraído da madeira (cerca de 85%) e das folhas (cerca de 81%) (LUPE, 2007). Segundo Alcântara et al. (2010), o óleo essencial extraído do caule de *A. rosaeodora* apresenta 89,4% de monoterpenos, devido à alta concentração de linalol (86%), sendo o segundo constituinte mais abundante o óxido de cariofileno (2,8%). Os autores relatam ainda a presença de: α -cadinol (1,2%), β -cariofileno (1,0%), copaeno (0,9%), γ -cadineno (0,9%), guaiol (0,8%), amorfeno (0,7%), santalenona (0,7%), longifolol (0,6%), α -terpineol (0,5%) e sabineno (0,1%). Maia et al. (2007) verificaram nas folhas de *A. rosaeodora* a presença de: linalol (85,5%), β -selineno (0,9%), óxido de cariofileno (0,8%), espatulenol (0,7%), α -copaeno (0,5%), 1,8-cineol (0,5%), α -pineno (0,4%), β -pineno (0,4%), α -selineno (0,4%), benzoato de benzila (0,2%), limoneno (0,1%), geraniol (0,1%), nerol (0,1%), terpinen-4-ol (0,1%), β -cariofileno (0,1%) e α -terpineol (0,1%).

O óleo essencial do pau-rosa tem alto valor no mercado de perfumaria. Depois de passar um período (de 2000 a 2003) de estabilidade nos preços, em torno de US\$ 33,3/kg, os valores atingiram US\$ 96,5/kg, em 2008. No mercado internacional, o óleo chega a custar US\$ 240/kg (FERRAZ et al., 2009).

Segundo Homma (2005), para produzir um tambor de óleo (180 kg) são necessárias 18 a 20 toneladas de madeira, sendo que uma árvore de tamanho adequado à extração pesa,

em média, 1,75 toneladas. As árvores de extração apresentam um diâmetro à altura do peito (DAP) variando entre 30 a 60 cm. Considerando que o rendimento do óleo essencial em relação ao peso da madeira é estimado entre 0,7% e 1,1%, uma tonelada de tora poderia produzir 10 kg de óleo essencial de pau-rosa. Estimando que, em média, há uma árvore a cada cinco hectares, o autor conclui que, no mínimo, 825 mil árvores foram derrubadas entre 1937 e 2002, para uma exportação de 13 mil toneladas de óleo, explorando, assim, uma área florestal de mais de 4 milhões de hectares.

De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, o IBAMA, para cada 180 litros de óleo produzido, 80 mudas de *A. rosaeodora* deveriam ser replantadas. O principal problema para a extração do óleo é a destruição da árvore, sendo que, para seguir a recomendação de reflorestamento adequado, são necessários 25 anos para que a planta atinja a fase adulta.

Nos últimos tempos, houve um declínio no consumo do óleo de pau-rosa, tanto pelo preço quanto pelo risco de causar a extinção da espécie, pois não é bem visto que uma empresa esteja vinculada a um processo de devastação ambiental. Fatores como a substituição do óleo natural de pau-rosa por correspondentes sintéticos e a inexistência de uma política florestal para o setor, também contribuíram para o declínio da exportação do óleo nas últimas décadas (SAMPAIO, 2000). Desta forma, novas fontes alternativas para a produção do linalol, estão sendo estudadas; entre elas, o manejo adequado dos plantios.

A formação de novos plantios de pau-rosa em áreas alteradas e/ou degradadas na Amazônia contribui não apenas para a recuperação dessas áreas, mas também, para a restauração dos serviços ambientais prestados pelas áreas florestadas. Uma alternativa para esse plantio está no consorciamento de espécies aromáticas (p. ex. pau-rosa, macacaporanga, louro, louro-rosa) com espécies produtoras de fibras (p. ex. curauá) e as alimentares (p. ex. mandioca) que, além de proporcionar uma cobertura vegetal mais intensa e conseqüentemente, maior proteção do solo, fornecem alimentos e fibras com demanda crescente em várias indústrias (automóveis, materiais isolantes, painéis, etc.) (LUPE et al., 2008).

O sucesso do manejo dos plantios de pau-rosa visando a produção de óleo a partir de galhos e de folhas depende da capacidade de rebrota e do crescimento dos novos brotos. Esta capacidade aliada à maior produtividade de óleo dos galhos e folhas em relação à

madeira das árvores indica que o uso de partes da árvore sem destruição da mesma, pode ser considerada uma alternativa promissora para o manejo sustentável de pau-rosa. Um estudo silvicultural demonstrou que a produtividade e a qualidade do óleo essencial de pau-rosa extraído de folhas e galhos de plantios de diferentes idades no município de Maués – AM são maiores em amostras com idades entre 2 a 5 anos (LIMA e CHAAR, 2006). No entanto, faz-se necessário um controle fitossanitário, visto que fungos fitopatogênicos causam sérios problemas e conseqüentes prejuízos para o manejo florestal de diferentes espécies (OSORIO et al., 2010).

1.2 FUNGOS

Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos, podendo apresentar-se sob a forma leveduriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas, que podem agrupar-se ou justapor-se, porém nunca formando um tecido verdadeiro. Constituem um grupo muito grande e heterogêneo encontrado virtualmente em qualquer nicho ecológico. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos, sendo que destas apenas foram descritas cerca de 74 mil espécies (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

A maioria dos fungos possui um corpo vegetativo filamentosos chamado de micélio, o qual se ramifica em todas as direções. Cada ramificação do micélio é chamada de hifa, geralmente apresenta espessura uniforme, de 2 a 10 μm de diâmetro, podendo alcançar até 100 μm em alguns fungos. O comprimento do micélio pode ser de poucos micrômetros, mas pode chegar até alguns metros (AGRIOS, 2005; ALTERTHUM, 2001). As hifas podem, ou não, apresentar partições delimitadas por paredes transversais denominadas septos. As hifas que apresentam septos são conhecidas como septadas, enquanto que aquelas sem septos são asseptadas (ARAÚJO et al., 2010).

O ciclo de vida dos fungos, diferentemente daquele dos animais e plantas não é obrigatório, mas sim, facultativo. Dessa maneira, se as condições do meio são ideais para o crescimento somático (vegetativo), então tal crescimento segue ocorrendo. Dessa forma, em laboratório, pode-se manter os fungos vivos na sua forma micelial ou leveduriforme por longos períodos de tempo. Entretanto, se há uma redução acentuada de nutrientes

disponíveis, então pode ocorrer uma seqüência de etapas de desenvolvimento que leva à esporulação (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Os fungos se reproduzem por meio de esporos (Figura 3), estruturas reprodutivas constituídas de uma ou mais células. Os esporos podem ser formados assexuadamente, gerados por mitose (mitósporos) que podem ser dos tipos: conídios, esporângios, clamidósporos ou artrósporos. Os conídios são produzidos a partir das hifas, em estruturas denominadas conidióforos. Os esporângios são estruturas em forma de saco cujo conteúdo por meio de clivagem se converte em um ou muitos esporos. Alguns desses esporos podem nadar, utilizando-se de flagelos, sendo denominados zoósporos. Os esporangióforos imóveis denominam-se aplanósporos. Em alguns fungos, as células das hifas aumentam, ganham uma forma arredondada com uma parede espessa e separam-se para formar clamidósporos. Os artrósporos são resultantes da fragmentação da hifa, em fungos hifais ou gemas em fungos leveduriformes (AGRIOS, 2005; ALTERTHUM, 2001).

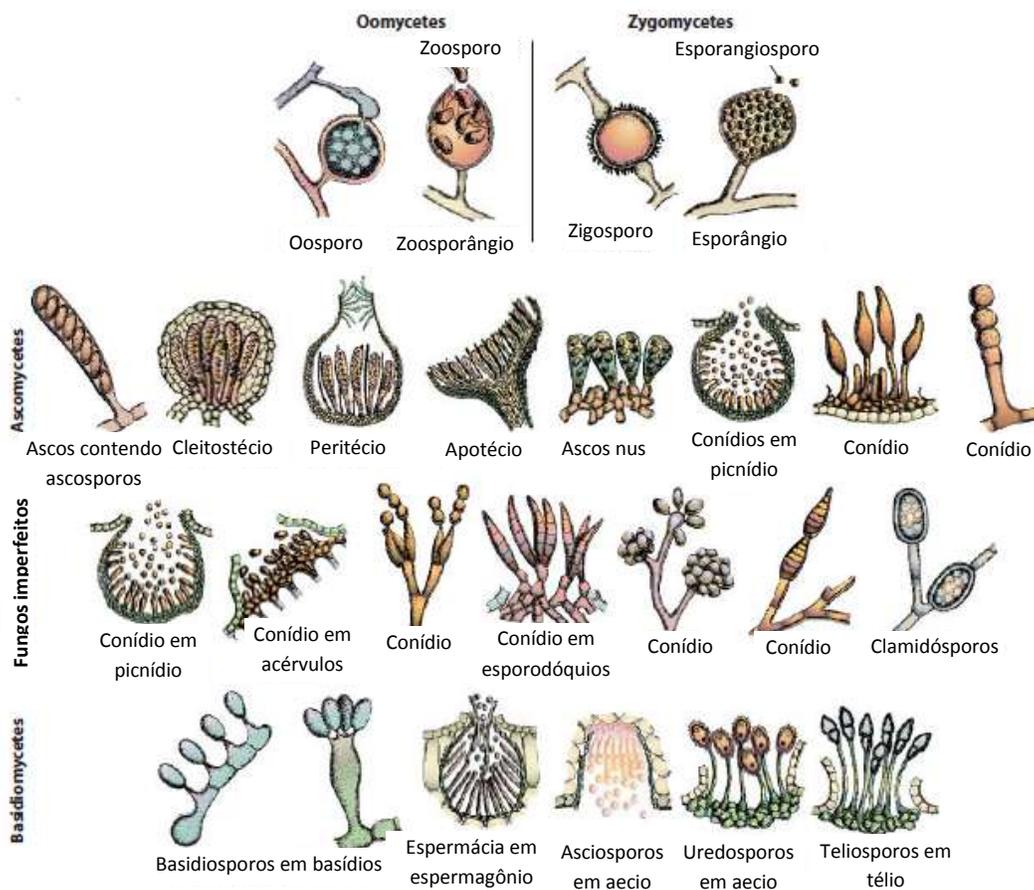


Figura 3. Esporos e corpos de frutificação dos principais grupos de fungos.

A reprodução sexuada, por sua vez, envolve plasmogamia (união de citoplasmas), cariogamia (união de núcleos) e conseqüentemente meiose, produzindo esporos (meiósporos) que podem ser dos tipos basidiósporos, ascósporos ou zigósporos. Esses esporos são produzidos por hifas diferenciadas denominadas, respectivamente, zigosporângios, ascos e basídios. Os basidiósporos são produzidos por fungos do grupo dos Basidiomycetes, os ascósporos são produzidos por fungos do grupo dos Ascomycetes, e os zigósporos são produzidos por fungos do grupo dos Zygomycetes (ARAÚJO et al., 2010; AGRIOS, 2005).

Os fungos estão agrupados dentro do Reino Fungi, subdivididos nos Filos Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. O filo Chytridiomycota apresenta células móveis em algumas fases de desenvolvimento do talo. São organismos associados a ambientes úmidos ou aquáticos, como rios, lagos, solos úmidos e em alguns casos, ambientes salobros e marinhos. Este filo possui uma única classe Chytridiomycetes, constituídas por cinco ordens: Spizellomycetes, Neocallymasticales, Chytridiales, Blastocladales e Monoblepharidales. O filo Zygomycota é constituído pelas classes Zigomycetes e Trichomycetes e seus esporos não apresentam flagelos, nem há centríolos. Os Zigomycetes são distinguidos pela produção do esporo de resistência de origem sexual, o zigósporo. Certas espécies são utilizadas na fabricação de produtos industriais como enzimas, pigmentos, ácidos orgânicos, entre outros. A classe Trichomycetes consiste em um grupo de organismos muito inconspícuos, no qual todos os membros estão associados com artrópodes vivos, inclusive em meio aquático. Certas espécies produzem grandes colônias no intestino dos animais, com aspecto de pelos, daí seu nome (AGRIOS, 2005; SILVA e COELHO, 2006).

O Filo Basidiomycota abriga aproximadamente 25 mil espécies catalogadas. Dentre estas, estão espécies com grande importância para o homem, como espécies de cogumelos comestíveis, espécies com potencial para biorremediação e espécies com alta atividade lignolítica e celulolítica, importantes para ciclagem de nutrientes. Além disso, muitas espécies são patógenas de plantas e de animais. O Filo Ascomycota abriga o maior número de espécies dentre todos os filios do Reino Fungi, possuindo aproximadamente 35 mil espécies conhecidas, distribuídas entre parasitas, simbioses e saprófitos. Muitas espécies são utilizadas em benefício humano, como *Saccharomyces cerevisiae* nos processos de

fermentação e *Penicillium chrysogenum* na produção de antibióticos. Outras espécies estão associadas diretamente a perdas econômicas, tais como as espécies parasitas de planta, *Giberella* spp. e *Claviceps* spp. (ARAÚJO et al., 2010).

Os fungos mitospóricos compõe um grupo artificial criado para agrupar espécies que possuem somente a fase de reprodução assexuada conhecida. Muitas destas espécies mitospóricas representam as fases assexuadas de fungos pertencentes aos Filos Ascomycota e Basidiomycota. Estudos mais antigos classificavam estes organismos em um filo próprio denominado Deuteromycota, entretanto esta prática caiu em desuso com adoção de parâmetro moleculares para estudos de filogenéticos, abolindo a criação de um filo artificial como alternativa taxonômica (ARAÚJO et al., 2010). Alguns fungos mitospóricos causam doenças em diversos tipos de plantas, tais como os gêneros *Alternaria*, *Ascochyta*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Phyllosticta*, *Pyricularia*, *Septoria* e *Stemphylium* (AGRIOS, 2005; SILVA e COELHO, 2006).

1.2.1 Fungos fitopatogênicos

Os organismos fitopatogênicos, tais como fungos, nematóides, bactérias e vírus causam uma quantidade significativa de doenças em plantas (MONTESINOS, 2003; HORST, 2008). Fungos fitopatogênicos, em especial, são responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes (FLETCHER et al., 2006), além de estar associados à indução do apodrecimento de frutas e verduras pós-colheita, diminuindo o conteúdo nutricional e aproveitamento destes alimentos (RAY e RAVI, 2005).

Os fungos fitopatogênicos são identificados, em sua maioria, pelos sintomas que provocam e pelos sinais presentes no hospedeiro, que são facilmente observados em campo, tais como manchas foliares, podridões, ramos secos, exsudações, entre outros (BATISTA et al., 2007). Os fungos causam sintomas locais ou genéricos em seus hospedeiros e tais sintomas podem ocorrer separadamente, ou em seqüência. Em geral, os fungos causam necrose de tecidos da planta e freqüentemente causam a redução do crescimento (nanismo) de órgãos ou da planta inteira (AGRIOS, 2005). Os sintomas mais comuns das doenças causadas por fungos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sintomas comuns de doenças provocadas por fungos fitopatogênicos.

SINTOMA e CARACTERÍSTICA	EXEMPLO
<p>Manchas foliares</p> <p>Lesões nas folhas, consistindo-se em células mortas ou em colapso.</p>	 <p>Mancha foliar causada por <i>Phyllosticta guajavae</i> em goiabeira.</p> <p>(JUNQUEIRA et al., 2001).</p>
<p>Ferrugem</p> <p>Escurecimento genérico, extremamente rápido, causando a morte de folhas, galhos, ramos e órgãos florais.</p>	 <p>Ferrugem causada por <i>Puccinia lantanae</i> em erva-cidreira-de-arbusto (<i>Lippia alba</i>).</p> <p>(RUSSOMANO e KRUPPA, 2010).</p>
<p>Cancro</p> <p>Lesão necrótica localizada no caule ou órgão carnudo.</p>	 <p>Cancro causado por <i>Cryphonectria cubensis</i> (Bruner) Hodges em eucalipto (<i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden).</p> <p>(AUER e KRUGNER, 1997).</p>
<p>Dieback</p> <p>Necrose extensiva de galhos, iniciando nas pontas e avançando até a base.</p>	 <p>Dieback em pinheiros (<i>Pinus radiata</i>), causada por <i>Sphaeropsis sapinea</i>.</p> <p>(WET et al., 2003)</p>

SINTOMA e CARACTERÍSTICA	EXEMPLO
<p>Podridão-de-raiz</p> <p>Desintegração ou decaimento de parte ou de todo o sistema radicular da planta.</p>	 <p>Podridão-de-raiz em fruta do conde (<i>Annona squamosa</i>), causada por <i>Phytophthora</i> spp.</p> <p>(JUNQUEIRA et al., 2001)</p>
<p>Tombamento das mudas (<i>Damping-off</i>)</p> <p>Morte rápida, devido ao colapso em mudas jovens.</p>	 <p>Tombamento das mudas em algodoeiro. Os principais agentes etiológicos são <i>Rhizoctonia solani</i> Khun e <i>Colletotrichum gossypii</i> South.</p> <p>(CHITARRA et al., 2009)</p>
<p>Podridão basal do caule</p> <p>Desintegração da porção inferior do caule.</p>	 <p>Podridão basal do caule em papaia (<i>Carica papaya</i> L.), causada pelo fungo <i>Phytophthora palmivora</i>.</p> <p>(ZHU et al., 2004)</p>
<p>Podridão mole e seca</p> <p>Maceração e desintegração de frutos, raízes, bulbos, tubérculos e folhas carnudas.</p>	 <p>Podridão mole em pêsegos (<i>Prunus persicae</i>) causada por <i>Rhizopus</i> spp..</p> <p>(MARTINS et al., 2006)</p>

SINTOMA e CARACTERÍSTICA	EXEMPLO	
<p>Antracnose</p> <p>Lesão necrótica ulcerosa do caule, folhas ou flores.</p>		<p>Antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> sp. em babosa (<i>Aloe vera</i>).</p> <p>(RUSSOMANO e KRUPPA, 2010)</p>
<p>Sarna</p> <p>Lesões localizadas em frutas, folhas, tubérculos, etc., usualmente apresentando uma aparência cascuda.</p>		<p>Sarna da macieira (<i>Malus domestica</i> Borkh.), causada por <i>Venturia inaequalis</i>.</p> <p>(CESA et al., 2006)</p>
<p>Declínio</p> <p>Perda progressiva do vigor, plantas com crescimento pobre, folhas pequenas, amareladas ou avermelhadas, frágeis, podendo apresentar desfoliação.</p>		<p>Declínio em videira (<i>Vitis</i> spp.) causada por <i>Cylindrocarpon</i> sp., <i>Phaeoacremonium</i> sp., <i>Verticillium</i> sp., <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>herbemontis</i>, <i>Botryosphaeria</i> sp., <i>Graphium</i> sp. e <i>Cylindrocladium</i> sp..</p> <p>(GARRIDO et al., 2003)</p>

Em muitas doenças, os fungos fitopatógenos crescem e produzem várias estruturas na superfície do hospedeiro. Essas estruturas incluem micélio, esclerócios, esporóforos, corpos de frutificação e esporos, considerados sinais. Os sinais são distintos dos sintomas, que se refere apenas à aparência da planta ou dos tecidos infectados. Portanto, nos míldios, por exemplo, os sinais consistem em branqueamento, crescimento de micélio e esporos fúngicos nas folhas, fruto ou caule da planta, enquanto os sintomas consistem de lesões necróticas ou cloróticas em folhas, frutos e caule, reduzindo o crescimento da planta. A Figura 4 ilustra diferentes doenças em vários tipos de plantas causadas por fungos mitospóricos e ascomicetos (AGRIOS, 2005).

Os fitopatógenos podem utilizar diversas formas para infectar o hospedeiro, as quais incluem sítios lesionados e aberturas naturais das plantas, tais como os estômatos. As enzimas que hidrolizam matéria orgânica em decomposição também podem ser utilizadas pelos patógenos para invadir os tecidos das plantas por meio da degradação de macromoléculas da parede celular. Nas primeiras etapas de uma infecção, ocorrem normalmente danos na parede celular. Os fungos fitopatogênicos excretam enzimas proteolíticas que causam a liberação de fragmentos da parede celular vegetal, como os oligômeros pécnicos. Estes fragmentos atuam como sinais, ligando-se a receptores específicos, desencadeando uma cascata de eventos que levam à indução de genes específicos de defesa (SLATER et al., 2008).

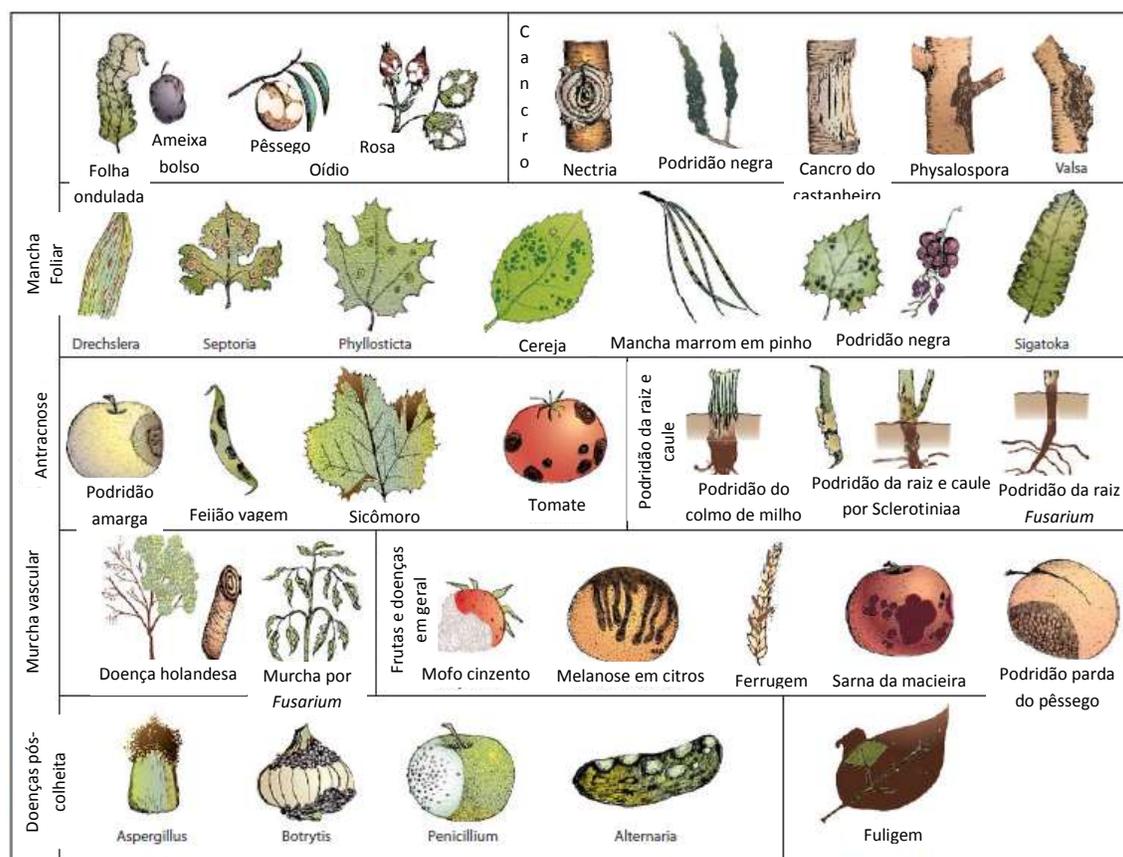


Figura 4. Sintomas comuns causados por fungos mitospóricos e ascomicetos.

Em isolamentos de fitopatógenos, é comum a aplicação do Postulado de Koch, o qual é utilizado para identificar se o patógeno isolado é o agente responsável por causar

doença em plantas (AGRIOS, 2005). Nesse caso, utiliza-se a inoculação de plantas saudas com o fitopatógeno isolado, de forma a confirmar o aparecimento de lesões na planta.

Alguns exemplos de fitopatógenos que afetam a cultura de limão e causam grandes prejuízos econômicos são: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus niger*, *Phytophthora* spp. (MALDONADO, et al., 2005). Há também a espécie *Moniliophthora perniciosa*, responsável por causar a doença popularmente conhecida como vassoura de bruxa (Figura 5), que acomete as plantações de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) (LOPES, et al., 2008; PIROVANI et al., 2008).



Figura 5. Sintoma da doença vassoura de bruxa em frutos de cacauzeiro.

O fitopatógeno *Penicillium sclerotigenum* apresenta ampla capacidade de adaptação a uma gama de plantas hospedeiras, podendo contaminar, por exemplo, pêras e maçãs com patulina, um metabólito secundário com atividade mutagênica e carcinogênica em animais, causando um sério risco para a saúde humana (TAKAHASHI e LUCAS, 2008). A contaminação de maçãs por *Penicillium* spp. pode ocorrer ainda no campo ou durante o processamento pós-colheita, ocasionando também a podridão dos frutos durante o armazenamento, que acarretará em perdas qualitativas e quantitativas (BOTELHO, 2009).

Nos últimos anos, as áreas de cultivo de uvas de mesa (*Vitis vinifera* L.) tem se expandido no Brasil, sendo a região Sul a maior produtora do país, contribuindo com 62% do total produzido, seguido pela região Nordeste com 21%. Porém, as perdas pós-colheita causam enormes prejuízos econômicos aos produtores, e as principais causas são os microrganismos fitopatogênicos, dentre os quais se destacam os fungos, responsáveis por cerca de 80 a 90% do total das perdas. Frequentemente, as infecções quiescentes são

causadas por fungos dos gêneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia* e *Botrytis*. No caso de infecções adquiridas por ferimentos que ocorrem após a colheita, destacam-se os fungos dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* entre outros, que manifestam rapidamente sintomas de podridões (CALDAS et al., 2008; CAMARGO et al., 2011; CHAVARRIA, et al., 2007; CAMILI, et al., 2007).

O fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* coloniza tecidos de plantas senescentes ou mortas, causando amolecimento dos frutos e podridão dos cachos, reduzindo drasticamente o rendimento e a qualidade das uvas (Figura 6). Este microrganismo é um patógeno presente em diversos ambientes, capaz de causar infecções mesmo em baixas temperaturas, provocando consideráveis perdas econômicas na pré e pós-colheita. As hifas podem penetrar através de lesões ou aberturas naturais do tecido da planta, e se espalhar para os tecidos saudáveis. Videiras acometidas por *B. cinerea* desenvolveram um sistema de resistência bioquímica que opera por meio da ação de moléculas sinalizadoras, como o salicilato, o jasmonato e o etileno, bem como pelo acúmulo de proteínas, fitoalexinas e outros compostos fenólicos (TIMPERIO et al., 2011).



Figura 6. Sintomas da podridão nobre provocada pelo fungo *Botrytis cinerea*.

O fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Bar) é o agente causal da brusone do arroz (Figura 7), que é considerada a doença mais importante da cultura, causando perdas significativas no rendimento das cultivares suscetíveis, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis ao seu desenvolvimento (CORNELIO et al., 2003; MALAVOLTA et al., 2009). No Brasil, outro importante hospedeiro desse patógeno é o trigo, que desde 1985 vem sofrendo frequentes quebras de

produtividade em muitas regiões do país devido ao ataque deste fungo (MARTINS et al., 2004).



Figura 7. Lesão causada pela doença brusone no arroz.

A cultura da melancia (*Citrullus lanatus*) é uma atividade agrícola importante para o Brasil, proporcionando retorno econômico para o produtor, e devido à exigência de mão-de-obra intensiva, é empregadora de mão de obra rural. Segundo a FAO (2002), no Brasil, a melancia ocupa uma área de 82 mil hectares e um volume de produção de 620.000 t, representando assim uma produtividade média de 7,56 t/ha. O crestamento gomoso do caule, provocado pelo fungo *Didymella bryoniae* (Figura 8), é uma das mais importantes doenças da melancia. O controle químico, embora amplamente adotado, nem sempre pode impedir o progresso da doença no campo. A resistência do agente causal a alguns fungicidas foi relatada na Europa, Japão e nos Estados Unidos, porém nenhum estudo foi realizado no Brasil (SANTOS et al., 2005, 2006).



Figura 8. Doença do crestamento gomoso do caule.

A cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L.) no Brasil vem adquirindo expressiva importância econômica em virtude, principalmente, da abertura do mercado externo. A região Nordeste responde por 99,3% da área plantada no país (14 mil ha) e por aproximadamente 99,5% da produção nacional (282 mil toneladas). A expansão da área cultivada no Nordeste brasileiro, aliada ao cultivo intensivo e contínuo durante todo o ano, tem contribuído para o aumento de doenças fúngicas (SANTOS et al., 2004). Na cultura do melão, a doença cancro da haste, causado por *Didymella bryoniae*, é atualmente a principal doença fúngica da cultura. Esta doença tem grande importância pela dificuldade no controle deste patógeno, devido à ausência de fungicidas que o controlem efetivamente e à inexistência de cultivares resistentes (GUALBERTO et al., 2001; RIZZO et al., 2003).

Diante da demanda por pesticidas ambientalmente corretos, existe a necessidade de desenvolver pesquisas para encontrar produtos alternativos para o controle de doenças causadas por fitopatógenos. Os fungos endofíticos são fontes promissoras de metabólitos secundários que apresentem atividade antifúngica, considerando os estudos reportados na literatura (CAFÊU et al., 2005; SILVA et al., 2010; TIMPERIO et al., 2011).

1.2.2 Fungos endofíticos

Endófitos são aqueles microrganismos que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados superficialmente, e que não causam dano ao hospedeiro. Estes microrganismos colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos e, portanto, podem ser importantes candidatos para o controle destes (ARAÚJO et al., 2010). Azevedo e Araújo (2007) conceituam os microrganismos endofíticos como aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais. A microbiota endofítica é composta principalmente por fungos e bactérias que podem conferir benefícios às plantas e estes benefícios podem ser recíprocos, resultando em um sistema simbiótico (AZEVEDO et al., 2000).

Os primeiros relatos da presença de microrganismos endofíticos no interior de tecidos de plantas datam do final do século XIX (MUNDT e HINKLE, 1976). Em 1898 foi detectado um fungo endofítico em sementes de *Lolium temulentum* L., e esta descoberta

desencadeou uma série de estudos, por vários pesquisadores da época, sobre novos fungos, principalmente ascomicetos, vivendo no interior de gramíneas sem, contudo, causar qualquer dano aparente (WHITE JR et al., 1996).

O estudo das comunidades endofíticas tem aumentado substancialmente nos últimos 30 anos, pois foi observado que esses microrganismos apresentam importante papel no desenvolvimento da planta hospedeira (ARAÚJO et al., 2010). A interação planta-endófito possibilita em alguns casos resistência contra patógenos, estímulo e indução do processo de germinação de sementes (VILA-AIUB et al., 2005), produção de substâncias bioativas como fitohormônios (YUE et al., 2000) e assim aumentar a competitividade do hospedeiro na natureza (TAN e ZOU, 2001). Possibilita ainda o aumento do crescimento vegetal. Estudos realizados por Silva et al. (2006) verificaram que fungos endofíticos isolados de *Annona* spp., dos gêneros *Acremonium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Cylindrocladium*, *Chaetomium* e *Fusarium* promoveram eficientemente o crescimento vegetal de mudas de pinha.

Microrganismos endofíticos já foram isolados de todas as espécies de plantas até agora analisadas. Devido à íntima associação entre os endófitos e espécies vegetais, tem sido sugerido que estes microrganismos co-evoluíram com os seus hospedeiros (MISAGHI e DONNDELINGE, 1990). Os endófitos são reconhecidamente úteis na agricultura e na indústria, sobretudo na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de novos genes de interesse em plantas (FAHEY, 1988; MURRAY et al., 1992), como agentes inibidores de pragas e patógenos (VOLKSCH et al., 1992; HALLMANN e SIKORA, 1996) e como fontes de metabólitos primários (STAMFORD et al., 1998) e secundários de interesse, tais como o taxol, poderoso anticancerígeno (STIERLE et al., 1993; WANG et al., 2002; SU et al., 2000), antibióticos (HOFFMAN et al., 2008; YU et al., 2010) e antifúngicos.

Os fungos endofíticos se configuram como uma rica fonte de novas substâncias bioativas, com potencialidades totalmente desconhecidas e que podem beneficiar diferentes tipos de indústria (BASHYAL et al., 2005; GUNATILAKA, 2006). É enorme a lista de produtos de interesse biotecnológico produzidos por endófitos. Todas essas possibilidades só existem porque fungos endofíticos produzem metabólitos ativos que são utilizados tanto pelos fungos quanto pela planta hospedeira. Como resultado direto dessas funções que os

metabólitos secundários bioativos exercem na natureza, ou por assim dizer, na espécie hospedeira, eles podem apresentar aplicações na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL, 2002; DING et al., 2008; EBEL et al., 2008; DEBBAB et al., 2009). Essas substâncias podem apresentar atividade antibacteriana (BRADY et al., 2001; MA et al., 2004), citotoxicidade contra células tumorais (WANG et al., 2002; BASHYAL et al., 2005), atividade antimalárica (ISAKA et al., 2001) e atividade antifúngica (BRADY e CLARDY, 2000).

A separação de grupos ditos patogênicos, endofíticos e oportunistas é meramente didática, uma vez que a distância de um estágio para o outro pode ser muito pequena. Assim, um microrganismo pode ser considerado endófito, mas com a redução dos mecanismos de defesa da planta, pode se comportar como um patógeno (MAKI, 2006). O que determina se um fungo é endofítico ou fitopatogênico é justamente o seu comportamento após a infecção, ou seja, que conseqüências esse microrganismo trará para a espécie hospedeira. Em resumo, os fitopatógenos ao entrar em contato com o hospedeiro, germinam com formação do apressório, liberam enzimas que degradam a parede celular e a planta tenta se defender com a produção de proteínas de resistência. Enquanto que o fungo endofítico, germina fora da célula vegetal, logo após o contato com a planta ocorre um reconhecimento e uma reprogramação da planta hospedeira para facilitar a entrada do endófito e finalmente o estabelecimento de uma relação simbiótica com a planta (KOGEL et al., 2006).

Dessa forma, o amplo conhecimento da comunidade microbiana e das interações que ocorrem na planta podem permitir a utilização destes microrganismos na agricultura, promovendo crescimento vegetal e/ou controlando patógenos de interesse, conseqüentemente reduzindo a utilização de agroquímicos e os custos de produção.

1.3 CONTROLE BIOLÓGICO

Embora efetivos e comumente utilizados na proteção de diferentes culturas, os fungicidas sintéticos utilizados no combate a fungos fitopatogênicos apresentam sérias restrições, visto que estão associados à poluição ambiental e problemas de saúde (SEO et al., 2009). Atualmente, com o desenvolvimento das culturas orgânicas, o uso de fungicidas

sintéticos tem causado um índice de rejeição ainda mais significativo por parte dos consumidores (OSORIO et al., 2010; SILVA et al., 2005). Além disso, a resistência de fitopatógenos aos fungicidas disponíveis comercialmente leva a um controle ineficiente de doenças nas diferentes culturas (AGUIN et al., 2006).

Dentro desse contexto, o controle biológico surge como uma alternativa interessante visando diminuir o uso de produtos químicos, podendo ainda, ser aplicado isoladamente ou como parte do sistema de manejo integrado de pragas e doenças (HANADA et al., 2009). Segundo Cook e Baker (1993), o controle biológico consiste na redução da densidade de inóculo, de um ou mais patógenos, realizado por um ou mais organismos, que não seja o homem.

Vários estudos relatam a capacidade de fungos em produzir compostos com ação antifúngica: Ethur et al. (2005) avaliaram a atividade antagonista de quatro gêneros frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, patógeno do pepineiro. Dos 112 isolados fúngicos iniciais, sobressaíram-se 17 do gênero *Trichoderma*, demonstrando o melhor desempenho deste gênero no teste *in vitro*. Soares et al. (2009) avaliaram o efeito de metabólitos secundários produzidos por estreptomicetos na germinação de esporos e no crescimento micelial dos fungos *Cladosporium fulvum* Cooke e *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici, ambos fitopatógenos do tomate. Foi observado que os metabólitos produzidos pelos estreptomicetos causaram até 94,1% de inibição da germinação de esporos de *C. fulvum*. Na cultura do cacaueteiro, o fungo *Trichoderma* tem sido utilizado com sucesso em restos de ramos doentes para o controle do fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa (SILVA et al., 2008; ALVES et al., 2005). Já o fungo endofítico *Gliocladium catenulatum* apresentou potencial como antagonista reduzindo em 70% a doença nas mudas de cacaueteiro testadas (RUBINI et al., 2005).

Estudos realizados por Batista-Júnior et al. (2002) comprovaram o efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias isoladas da rizosfera frente aos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, isolado de feijoeiro com sinais da doença; *F. solani* f. sp. *glycines*, isolado de plantas de soja e *F. oxysporum* e *Colletotrichum* sp., ambos isolados de algodoeiro.

Recentemente vem sendo reportado o uso de microrganismos endofíticos como agentes para o controle biológico e produção de antifúngicos, devido à habilidade única dos

mesmos de sobreviver dentro das plantas com pouca ou nenhuma competição microbiana (MISAGHI e DONNDELINGE, 1990). Wang et al. (2008) descreveram a atividade de metabólitos secundários de *Penicillium* sp., isolado das folhas de *Hopea hainanensis*, relatando a ação destes contra *C. albicans* e *Aspergillus niger*. Li et al. (2005) realizaram um *screening* das plantas medicinais chinesas na busca de fungos endofíticos com atividade antitumoral e antifúngica, onde 9,2% dos isolados apresentaram atividade antitumoral e 30% exibiram atividade antifúngica. Arnold et al. (2003), mostraram o efeito protetor dos endófitos em relação à inoculação de *Phytophthora* sp., o principal patógeno da cultura de cacau no Panamá. Tunalí et al. (2000) comprovaram o efeito *in vitro* de quatro isolados de fungos endofíticos de centeio, no controle de patógenos de podridão da raiz. Narisawa et al. (2002) selecionaram 11 fungos endofíticos com potencial de suprimir, quase que completamente, os efeitos da infecção de *Verticillium dahliae* em berinjela.

Banhos (2011) verificou atividade antifúngica de extratos obtidos de metabólitos secundários de fungos endofíticos de *Myrcia guianensis*. Os extratos apresentaram efeito inibitório frente as cepas patogênicas *Candida albicans* e *Penicillium avelani*. Os metabólitos do endofítico do gênero *Blakeslea* apresentou os resultados mais promissores, inibindo o crescimento de *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. avelani*, sendo a inibição do crescimento fúngico comparável à observada na presença de cetoconazol.

Embora as pesquisas com fitopatógenos de diversas culturas sejam bastante extensas, praticamente nada se conhece sobre aqueles associados a *A. roseaodora* (pau-rosa), os quais acabam por prejudicar o desenvolvimento da planta. Assim, diante da necessidade de melhorar o manejo sustentável do plantio de rebrotas de pau-rosa, objetivando o melhor aproveitamento da produção do óleo essencial rico em linalol, foi objetivo desse trabalho, o isolamento e a caracterização dos patógenos associados a este hospedeiro, bem como verificar a ação inibitória dos metabólitos produzidos por fungos endofíticos isolados de *Myrcia guianensis* frente aos fitopatógenos isolados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de fungos endofíticos isolados de *Myrcia guianensis* em produzir compostos com ação inibitória sobre fungos fitopatógenos isolados de pau-rosa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos fitopatogênicos de mudas de pau-rosa;
- Caracterizar os fitopatógenos isolados, por meio de macro e micromorfologia;
- Obter os metabólitos secundários dos fungos endofíticos de *M. guianensis*;
- Avaliar a atividade inibitória dos metabólitos fúngicos frente aos fitopatógenos do pau-rosa e de linhagens fitopatogênicas do arroz e da melancia.
- Confirmar a patogenicidade dos fungos isolados de pau-rosa;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Hospedeiros vegetais: *Aniba rosaeodora* e *Myrcia guianensis*

O material vegetal utilizado neste trabalho foi proveniente de mudas de *Aniba rosaeodora* de aproximadamente dois anos de idade, coletadas na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos, localizado na Escola Superior de Tecnologia da UEA (EST-UEA). Para a coleta, foram escolhidas oito mudas de dois talhões, cujas folhas apresentavam lesões (Figura 09). As folhas foram coletadas, identificadas e armazenadas em sacos plásticos autoclavados e transportadas ao Laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT-UEA), para o isolamento dos fungos fitopatogênicos.

M. guianensis (pedra-ume-caá) foi escolhida como hospedeiro para o isolamento de endófitos, no trabalho desenvolvido por Banhos (2011).



Figura 9. Folhas lesionadas utilizadas para o isolamento de fitopatógenos.

3.1.2 Microrganismos

Os fungos endofíticos de *M. guianensis* utilizados foram isolados do material vegetal coletado por Banhos (2011) na Comunidade de São Pedro, localizada no município de Santarém/PA, em fevereiro de 2009.

Todos os fungos edofíticos de *M. guianensis* isolados, foram repicados para tubos inclinados e receberam uma identificação própria (código), e para a elaboração do código. Para a elaboração do código foi levado em consideração o nome da planta *M. guianensis* (Mg), a origem do fragmento de onde o fungo foi isolado (Folha -F, CórTEX do Caule - C, Casca do Caule - Ce, CórTEX da Raiz - R e Casca da Raiz - Re), o número do espécime (nº) de onde se isolou o fungo, e a posição do fragmento na placa (nº). Os fungos que cresceram de um mesmo fragmento vegetal foram identificados recebendo uma letra maiúscula diferente no final de seu código (A, B ou C). Os fungos endofíticos foram ainda agrupados e identificados de acordo com as suas características micro e macromorfológicas (Tabela 2) (BANHOS, 2011).

3.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS FITOPATÓGENOS DE PAU-ROSA

Para o isolamento dos fungos fitopatogênicos utilizou-se a metodologia descrita por Batista et al. (2007), com modificações. As folhas foram lavadas com água corrente e, em seguida, foi realizada a assepsia das folhas em solução de água sanitária comercial (Brinorte) a 1,5% durante 2 minutos, seguida da lavagem com álcool 70% por 1 minuto e com água destilada autoclavada por duas vezes. A última água do processo de lavagem foi semeada para compor o controle negativo. Após a desinfecção, as folhas foram cortadas na margem da área lesionada em fragmentos de aproximadamente 2 mm², os quais foram transferidos para placas contendo meio ágar batata dextrose (BDA, Himedia) acrescido de cloranfenicol a 0,04 mg/mL. As placas, em duplicata, contendo 6 fragmentos vegetais, foram incubadas a 28°C, em estufa tipo BOD, por 2 a 5 dias. Os fungos isolados foram purificados através da obtenção de culturas monospóricas, as quais foram conservadas em microtubos tipo eppendorf contendo glicerol 15% e mantidas a 4°C (BANHOS, 2011).

Os fungos isolados do pau-rosa receberam uma identificação própria (código), e para a elaboração do código foi levado em consideração o talhão do qual a muda foi retirada (T) e a muda da qual se isolou o fungo (M).

Tabela 2. Isolados de fungos endofíticos de *M. guianensis* selecionados para cultivo e obtenção do meio líquido metabólico.

Nº	ISOLADO	TECIDO DE ORIGEM	PROVÁVEL GÊNERO
1	MgF2 2.3	Folha	<i>Pestalotiopsis</i>
2	Mg R2 2.2	Raiz (Córtex)	<i>Pestalotiopsis</i>
3	MgF1 3.3	Folha	<i>Pestalotiopsis</i>
4	MgF3 3.3	Folha	<i>Pestalotiopsis</i>
5	MgC1 3.3	Caule (Córtex)	<i>Pestalotiopsis</i>
6	Mg F3 3.1	Folha	<i>Pestalotiopsis</i>
7	Mg F2 3.3	Folha	<i>Pestalotiopsis</i>
8	Mg C1 1.1	Caule (Córtex)	<i>Pestalotiopsis</i>
9	Mg F2 2.1	Folha	<i>Pestalotiopsis</i>
10	Mg F2 1.2	Folha	<i>Pestalotiopsis</i>
11	Mg Ce2 2.3	Caule (Casca)	<i>Pestalotiopsis</i>
12	Mg F2 1.3	Folha	<i>Pestalotiopsis</i>
13	Mg Ce3 3.1 A	Caule (Casca)	<i>Phomopsis</i>
14	Mg Ce1 3.2	Caule (Casca)	<i>Phomopsis</i>
15	Mg C2 3.2	Caule (Córtex)	<i>Phomopsis</i>
16	MgRe1 1.1	Raiz	<i>Phomopsis</i>
17	Mg F1 2.1	Folha	<i>Phomopsis</i>
18	Mg F 3.3.1 B	Folha	<i>Phomopsis</i>
19	Mg F 3.3.1 A	Folha	<i>Phomopsis</i>
20	Mg Re1 3.2	Raiz (Casca)	<i>Aspergillus</i>
21	Mg C3 2.2	Caule (Córtex)	<i>Aspergillus</i>
22	MgC2 2.1	Caule (Córtex)	<i>Aspergillus</i>
23	MgRe2 1.1	Raiz (Casca)	<i>Aspergillus</i>
24	MgC1 2.3	Caule (Córtex)	<i>Xylaria</i>
25	MgF2 3.3	Folha	<i>Xylaria</i>
26	MgRe3 3.1	Raiz (Casca)	Desconhecido
27	MgCe3 3.1	Caule (Casca)	Desconhecido
28	MgCe2 2.1	Caule (Casca)	Desconhecido
29	MgCe2 2.3 B	Caule (Casca)	Desconhecido
30	Mg R2.1.1	Raiz (Córtex)	Desconhecido
31	MgF1 2.2	Folha	Desconhecido
32	MgC2 3.2 B	Caule (Córtex)	<i>Penicillium</i>
33	MgR1 1.2	Raiz (Casca)	Desconhecido
34	MgRe1 3.2	Raiz (Casca)	Desconhecido
35	MgC2 3.3	Caule (Córtex)	Desconhecido
36	MgF2 2.1	Folha	Desconhecido
37	MgCe3 2.1	Caule (Casca)	Desconhecido
38	MgRe3 1.1	Raiz (Casca)	Desconhecido
39	MgF1 3.2 A	Folha	Desconhecido
40	MgF1 3.2 B	Folha	<i>Fusarium</i>

3.3 INOCULAÇÃO E RE-ISOLAMENTO DOS PATÓGENOS

Os patógenos isolados e purificados foram inoculados em plantas sadias (Figura 10a) cultivadas na Casa de Vegetação pertencente ao Laboratório de Cultura de Tecidos, localizado na EST- UEA. Foram escolhidas 18 mudas, as quais foram identificadas e numeradas. Para a inoculação foram escolhidas duas folhas de cada muda, preferencialmente as apicais por serem mais jovens e mais tenras. As folhas foram lavadas com água destilada autoclavada e em seguida, suavemente desinfetadas com algodão umedecido em álcool 70% (Figura 10b).

Após a desinfecção, foi realizada em cada folha uma pequena abrasão com auxílio de uma lixa (Figura 10c), e sobre a área, depositado um fragmento de ágar contendo micélio do fungo (Figura 10d). Nas mudas utilizadas como controle negativo, apenas fragmentos de ágar foram depositados na superfície foliar.

Após essa etapa, as mudas foram transferidas para uma câmara úmida e mantidas em casa de vegetação durante 21 dias, em local com incidência diária de 4 horas de sol. Para garantir a umidade, foram colocados dentro da câmara úmida, copos com algodão embebido em água destilada autoclavada, sendo periodicamente umedecido.

Logo após esse período, foi realizado o re-isolamento dos fungos seguindo a metodologia empregada no item 4.2.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS POR MACRO E MICROMORFOLOGIA

A caracterização dos fungos filamentosos baseou-se em anotações das características macromorfológicas das colônias dos fungos, tais como: bordas, textura, relevo e pigmentação. A micromorfologia foi realizada por meio da análise de microcultivo, onde lamínulas previamente autoclavadas foram sobrepostas a *spots* do fungo em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após um período de 3-7 dias de incubação a 28°C, as lamínulas foram coletadas com pinça e depositadas sobre lâmina de microscopia contendo uma gota de lactofenol cotton blue (Sigma). A análise foi feita em microscópio de luz, em aumentos de 400 ou 1000X, visando à observação de estruturas

reprodutivas e vegetativas, tais como: conídios, conidióforos, hifas, entre outros (ALEXOPOULOS et al., 1996; LACAZ et al., 2002; SIDRIM e ROCHA, 2004).

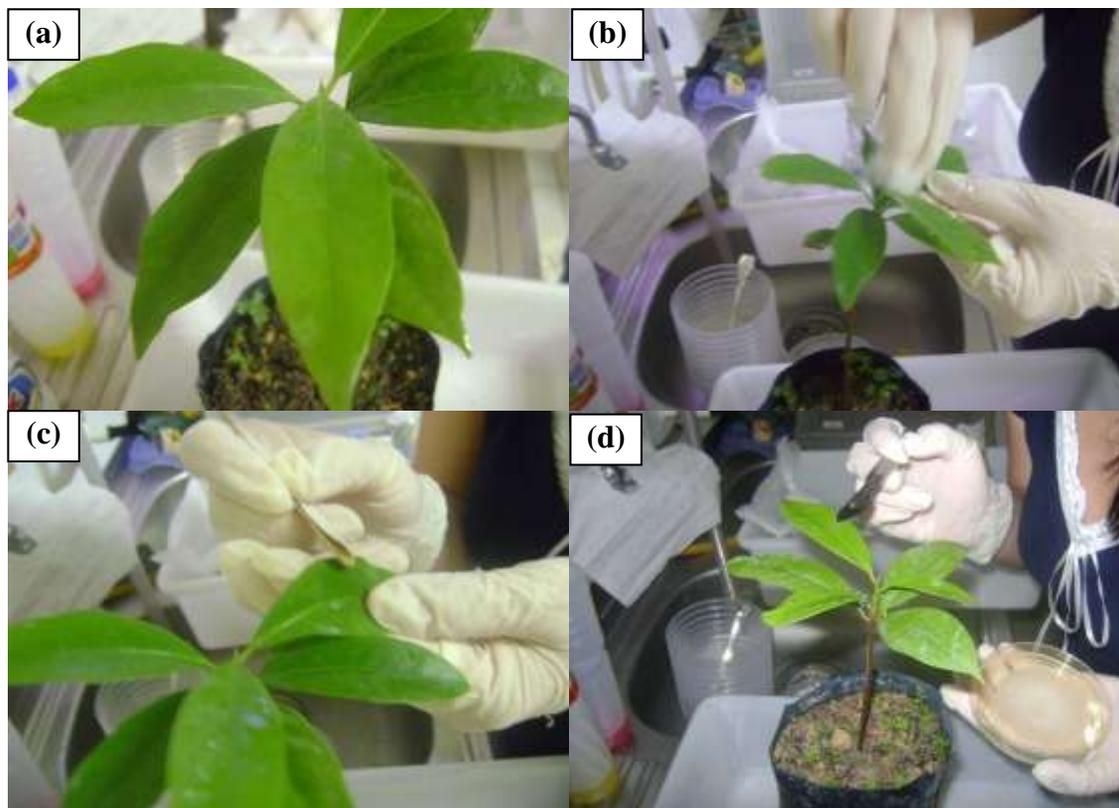


Figura 10. Em (a) mudas saudáveis de pau-rosa, (b) assepsia, (c) abrasão das folhas e (d) deposição do fragmento fúngico.

3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Após o re-isolamento dos fungos fitopatogênicos, os mesmos foram comparados macromorfologicamente com os fungos que haviam sido inoculados nas mudas saudáveis. A partir dessa comparação, os fungos que apresentaram características macromorfológicas semelhantes foram selecionados para a extração de DNA, e estão listados na Tabela 3.

Para a extração de DNA, os dez fungos selecionados (D1 a D10) foram cultivados em frascos erlenmeyer contendo 50 mL de meio BD. Após a inoculação, estes frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 28°C por 48-72 horas, dependendo do tempo de crescimento do fungo. Após o crescimento, a massa micelial foi coletada por filtração com

auxílio de uma bomba a vácuo e lavada com água destilada autoclavada. O micélio obtido foi embalado em folha de alumínio autoclavada e identificado. Após este procedimento a amostra foi conservada a -20°C até o momento da extração.

Tabela 3. Fungos inoculados e re-isolados de mudas de pau-rosa.

FUNGOS INOCULADOS	FUNGOS RE-ISOLADOS
T3/M4 04	M8/R1 03
T3/M2 05	M5/R2 04
T3/M1 09	M3/R1 02 M3/R2 07 M3/R2 06
T4/M3 11	M4/R2 03

Aproximadamente um grama do micélio foi triturado com nitrogênio líquido até formar um pó, o qual foi transferido imediatamente para um tubo de microcentrífuga. Foi adicionado 1,0 mL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; NaCl 200 mM; SDS 0,8%; PVP 1%; água ultra-pura Milli-Q) para cada grama de micélio. Após a homogeneização, os tubos de microcentrífuga foram incubados por 30 minutos a 65°C . Após o período de incubação foi adicionado 1 volume de fenol, misturando suavemente as fases, sendo em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga e a este foi adicionado um volume de clorofane (fenol:clorofórmio 1:1 v/v). Novamente a solução foi homogeneizada e centrifugada na mesma condição anterior, onde o sobrenadante foi recuperado e transferido para um outro tubo de microcentrífuga e a este foi adicionado um volume de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 v/v). Mais uma vez, os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante, mais uma vez, foi transferido para outro tubo de microcentrífuga e a este foi acrescentado NaCl 3,0 M para uma concentração final de 0,3 M. A seguir, foram adicionados dois volumes de etanol resfriado a -20°C . Após homogeneização suave, foi possível visualizar o DNA precipitado. As amostras foram submetidas à centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi lavado com etanol 70%. Os tubos foram invertidos até secagem completa do

pellet, o qual foi ressuspenso em 200 μ L de tampão TE (Tris-HCl 1,0 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0; água destilada).

A concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose-TAE 1% (Trizma-Base; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,5M pH 8,0; água destilada), juntamente com o marcador 1Kb (LGC). As amostras de DNA (3,0 μ L) foram misturadas a 1,0 μ L de Blue Green Dye (LGC) e aplicadas no gel. Após o término da eletroforese, o gel foi revelado em transluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

3.6 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR ENDÓFITOS DE *M. guianensis*

Para obtenção dos meios metabólicos dos fungos endofíticos, inoculou-se um fragmento de aproximadamente 5x5 mm, em triplicata, em frascos erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de meio batata-dextrose (BD), acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis (SOUZA et al., 2004). Os frascos foram incubados em incubadora tipo shaker de 8 até 11 dias, sob temperatura de aproximadamente 28°C e agitação de 120 rpm. Após o cultivo, o meio metabólico foi primeiramente filtrado a vácuo em funil de Büchner para separação do micélio, e em seguida, filtrado em membrana Millipore de 22 μ m. O meio líquido foi, então, armazenado em temperatura de aproximadamente 4°C para posterior utilização nos testes de atividade antifúngica.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os metabólitos secundários de fungos endofíticos de *Myrcia guianensis* foram testados contra os fungos isolados de pau-rosa e frente às cepas padrão de *Pyricularia grisea* e *Didymella bryoniae*, fitopatógenos do arroz e da melancia, respectivamente, cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Gil Rodrigues. Os ensaios foram realizados em placas de Petri onde, em uma extremidade foi feito um poço com 6 mm de diâmetro no meio de cultura, sendo posteriormente adicionados 50 μ L dos extratos brutos e na extremidade adjacente foi inoculado o fungo fitopatogênico. Foram realizadas cinco repetições de todos os ensaios. Foram considerados como resultados positivos para atividade antifúngica

quando pelo menos três replicatas apresentaram halo de inibição. No controle negativo, foi adicionado ao poço somente o meio BD. As culturas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28°C para crescimento do micélio do fungo fitopatogênico. Após cinco dias de incubação, foi verificada a presença ou ausência da inibição do crescimento do isolado fitopatogênico pelos metabólitos secundários.

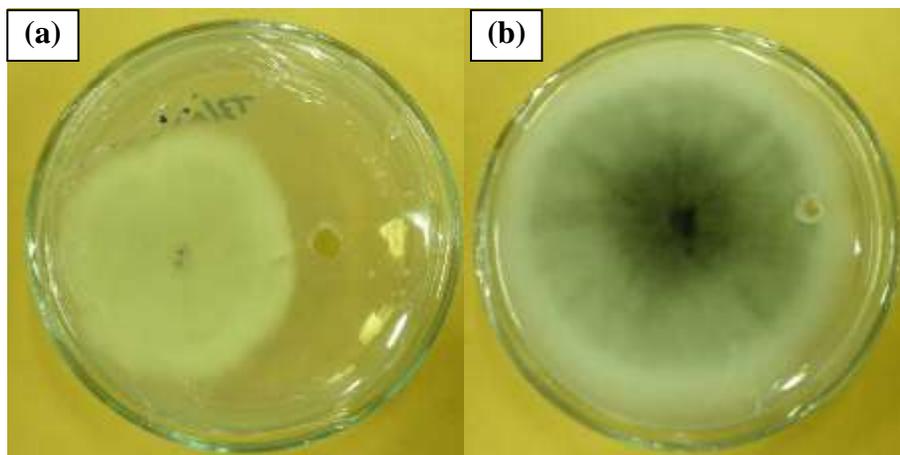


Figura 11. Ensaio de atividade antifúngica. Em (a) halo de inibição promovido pelo meio metabólico, e em (b) placa de controle negativo. DOUGLAS, ACHO MELHOR TIRAR ESSA FIGURA DAQUI E COLOCAR EM RESULTADOS, OK;

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, INOCULAÇÃO E RE-ISOLAMENTO DOS FITOPATÓGENOS DE PAU-ROSA

Foram obtidos 16 isolados purificados (Figura 12), os quais foram conservados em tubos de microcentrífuga contendo glicerol a 15% e mantidos a 4°C.



Figura 12. Fungos fitopatogênicos isolados de pau-rosa. **AQUI, NÃO É POSSÍVEL SUBSTITUIR AQUELA FIGURA COM O MICÉLIO RASPADO; OUTRA COISA... COLOQUE A IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS!**

Os isolados foram inoculados em mudas saudáveis de pau-rosa e após a inoculação, foi feito um acompanhamento diário do desenvolvimento das lesões nas mudas. De acordo com a Figura 13, foi possível observar que após o primeiro dia da inoculação, a região inoculada apresentou aspecto diferente se comparado ao controle negativo: nas folhas do controle negativo foram observadas as indicações da abrasão, enquanto nas folhas teste foram observadas lesões tipo mancha foliar com características de necrose, progressivamente aumentadas e de coloração marrom. Esta observação indica a possibilidade de que os fungos inoculados tenham colonizado as mudas.



Figura 13. Morfologia das lesões após a inoculação dos possíveis fitopatógenos de pau-rosa em mudas de *A. roseaodora*: Controle negativo (a); lesões da muda n° 7, um dia após a inoculação (b); lesões da muda n° 8 após um dia da inoculação (c) e folhas coletadas para o re-isolamento, após 21 dias da inoculação (d).

Ao final de 21 dias de observação, as folhas foram coletadas (Figura 13d) e submetidas ao re-isolamento. Foram obtidos 52 fungos a partir do re-isolamento, os quais foram comparados macromorfológicamente. Observou-se que cinco fungos apresentaram características morfológicas semelhantes a três dos 14 fungos inoculados inicialmente, e estes isolados foram comparados micromorfológicamente (Figuras 14, 15, 16 e 17).

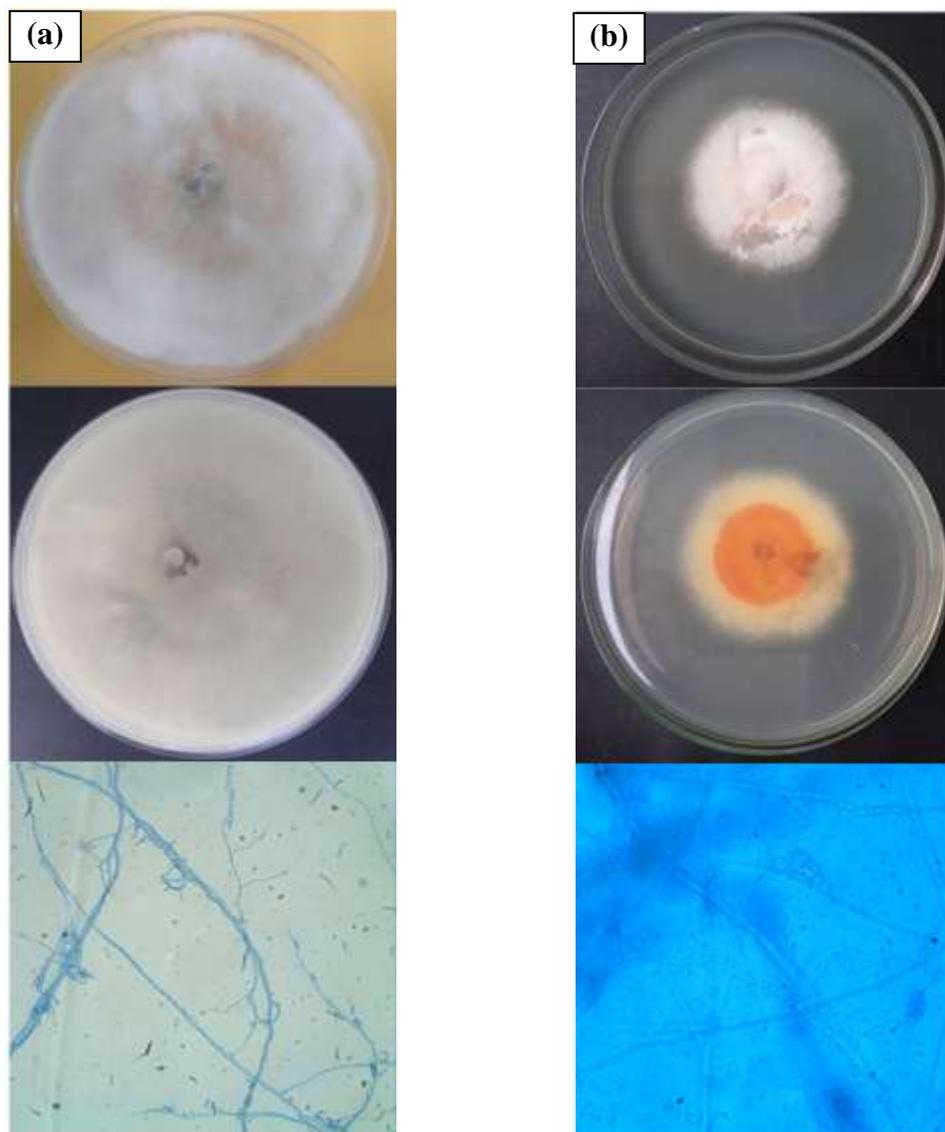


Figura 14. Características macro e micromorfológicas do fungo inoculado T3/M2 05 (a) e do re-isolado M5/R2 04 (b).

Como pode ser observado na Figura 14, apesar da semelhança macromorfológica das colônias, onde ambas apresentam inicialmente coloração branca, o fungo re-isolado é diferente do inoculado inicialmente, pois o fungo T3/M2 05 apresenta características

micromorfológicas que possibilitaram sua identificação como pertencente ao gênero *Fusarium* sp., enquanto que o fungo re-isolado M5/R2 04, segundo suas características micromorfológicas foi identificado como pertencente ao gênero *Cladosporium* sp. Embora os dois fungos não pertençam ao mesmo gênero, pode-se destacar a importância dos mesmos na fitopatologia, visto que diversos trabalhos relatam a patogenicidade destes gêneros em diferentes culturas agrícolas (WANG, et al., 2007; GUIMARÃES, et al., 2011).

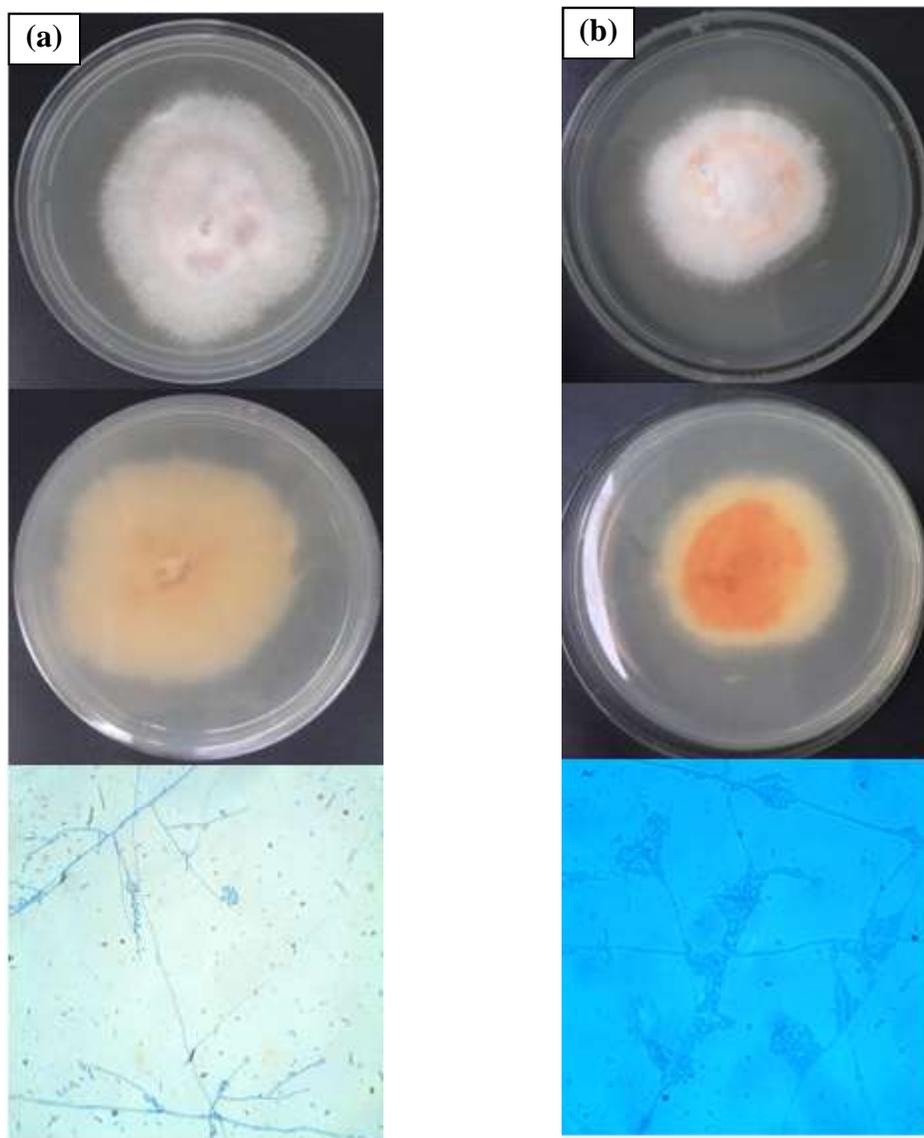


Figura 15. Características macro e micromorfológicas do fungo inoculado T3/M1 09 (a) e re-isolado M3/R1 02 (b).

De acordo com a Figura 15, pode-se observar que as colônias dos dois fungos apresentam coloração branca, de aspecto cotonoso. Porém, analisar o microcultivo, observa-se que o fungo T3/M1 09 apresenta microconídios, característica essa que o identifica como pertencente ao gênero *Fusarium* sp., enquanto que, de acordo com as características macro e micromorfológicas observadas no fungo M5/R2 04, o mesmo foi identificado como pertencente ao gênero *Cladosporium* sp.. Estes gêneros foram citados anteriormente como fitopatógenos importantes, causadores de perdas na agricultura (BARBOSA et al., 2001; NOGUEIRA, et al., 2007).

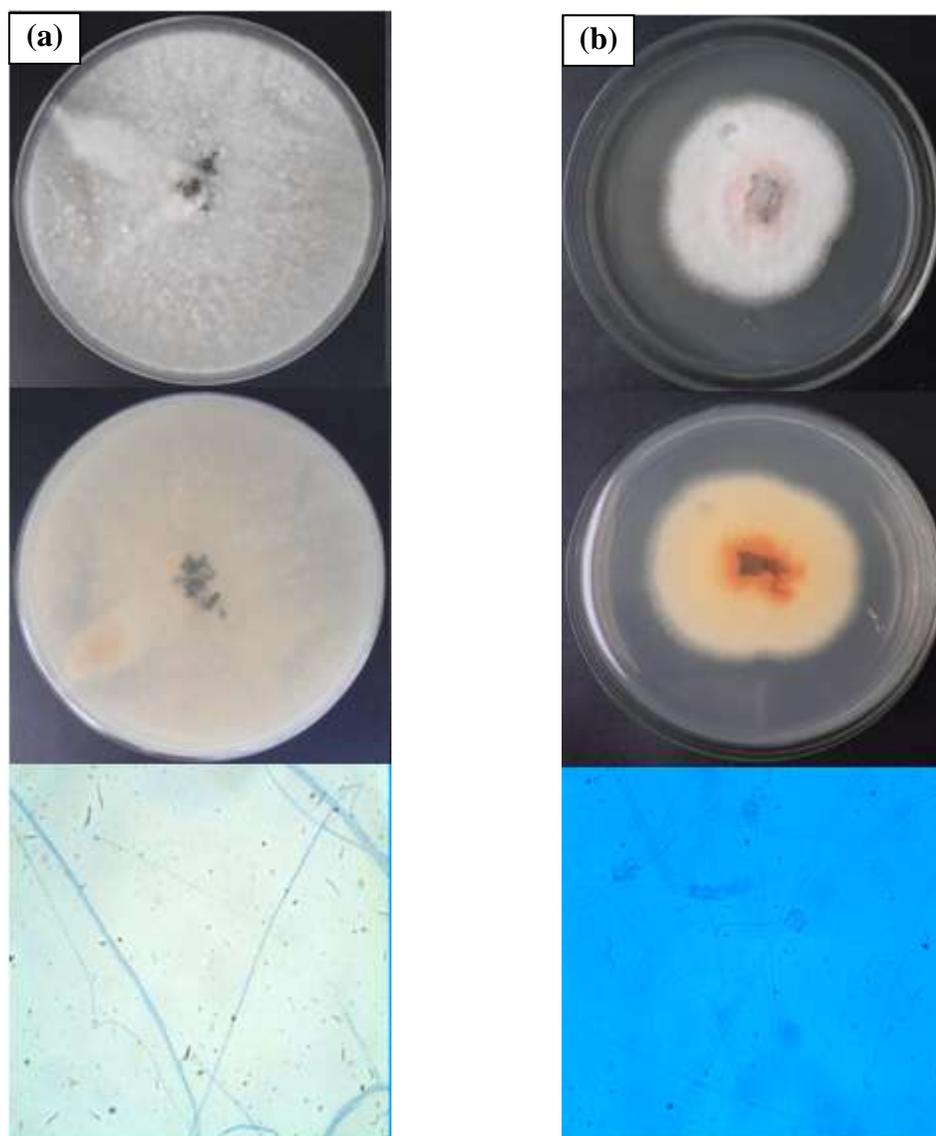


Figura 16. Características macro e micromorfológicas do fungo inoculado T4/M3 11 (a) e re-isolado M4/R2 03 (b).

Na comparação entre os fungos T4/M3 11 e M4/R2 03, verifica-se que as colônias apresentam inicialmente coloração branca, porém observou-se uma mudança nas características macromorfológicas durante o crescimento micelial e essa semelhança não se confirmou. O isolado T4/M3 11 (Figura 16a) não apresentou esporos, o que impossibilitou sua identificação taxonômica sendo, portanto, incluído no grupo *Mycelia sterilia*. O fungo re-isolado M4/R2 03 (Figura 16b) apresentou crescimento lento e colônia pulverulenta e aveludada, sendo possível observar no microcultivo a presença de conídios elípticos, sendo então identificado como pertencente ao gênero *Cladosporium* sp..

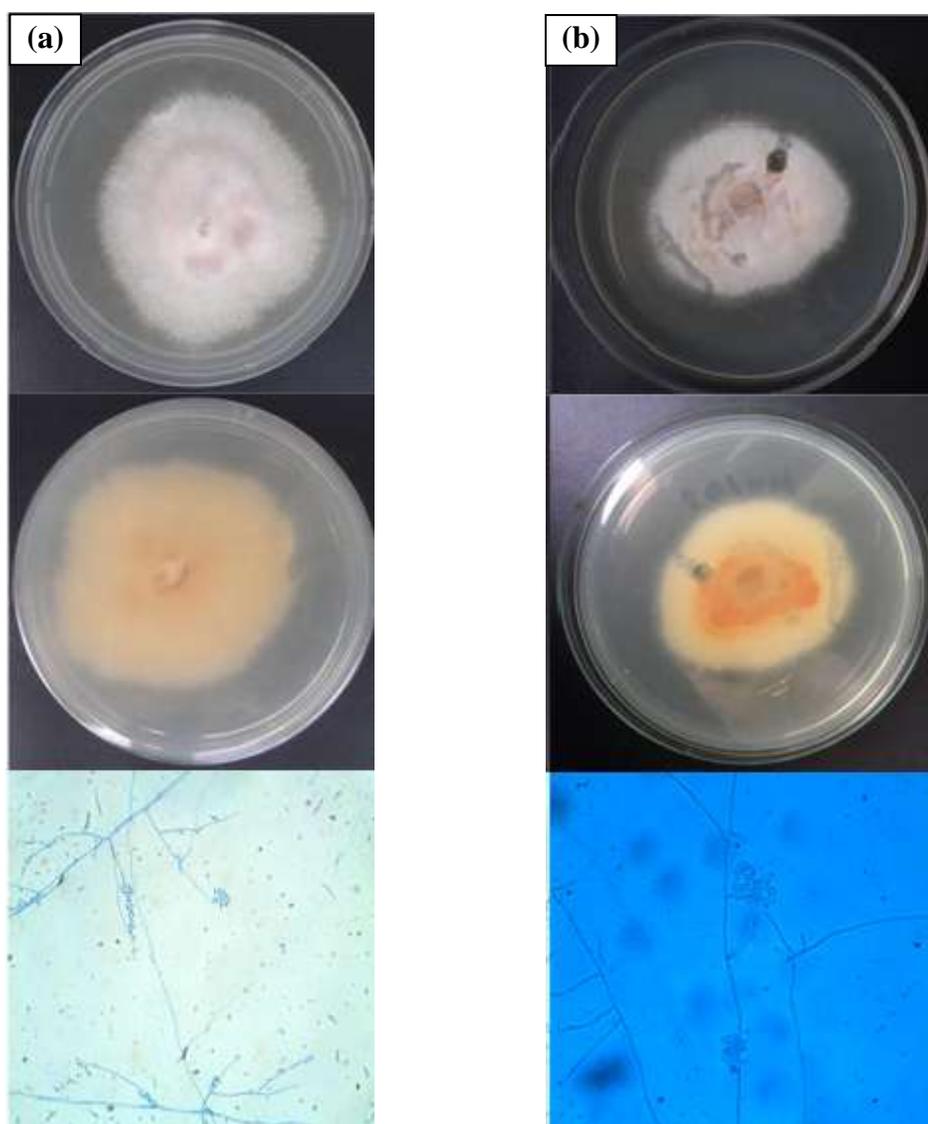


Figura 17. Características macro e micromorfológicas do fungo inoculado T3/M1 09 (a) e re-isolado M3/R2 06 (b).

Foi possível confirmar a patogenicidade do isolado T3/M1 09 (Figura 17a) a partir do re-isolamento do fungo M3/R2 06 (Figura 17b) de mudas de pau-rosa. As características macro e micromorfológicas dos dois isolados, tais como colônia com coloração branca, fundo bege, textura cotonosa, e presença de micrônídios cilíndricos de coloração clara sem septos, possibilitaram sua identificação como pertencentes ao gênero *Fusarium* sp..

Diversas espécies de *Fusarium* vem sendo reportadas como fitopatógenas e saprófitas do solo. Alguns grupos habitam as regiões aéreas superiores de plantas, sendo que a maior parte das espécies do gênero parasitam sementes de cereais e outros frutos do campo, causando danos antes e após a colheita (ZACARONI et al., 2009). A ocorrência da espécie *F. graminearum* em gramíneas como milho e cereais de inverno, tais como o trigo e a cevada, causa redução na produção dos mesmos, acarretando prejuízos consideráveis à economia e à sociedade brasileira, tendo em vista a grande importância agrícola dessas culturas (PANDOLFI, 2006). A espécie *F. oxysporum* é responsável pela ocorrência da doença murcha ou fusariose em tomateiros (ILTCHENCO et al., 2010) e feijoeiros (PANDOLFO, 2007), prejudicando a produtividade e a comercialização dessas culturas no Brasil.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS POR MACRO E MICROMORFOLOGIA

Os fungos T3/M1 09 e T3/M2 05, apresentam como característica macromorfológica colônias inicialmente de coloração branca, tornando-se bege, marrom, rosa e violeta com textura cotonosa a lanosa (Figura 18 a,b). O fundo da colônia normalmente é incolor, bege, rosa ou violeta (Figura 18 c, d). Como características microscópicas observam-se hifas de coloração clara, septadas, produzindo dois tipos de conidióforos e conídios (Figura 18 e, f). Os microconídios são ovais ou cilíndricos, pequenos, de coloração clara, sem septos, ou com um septo transversal, sendo produzidos em microconidióforos pequenos ou grandes, retos e sem ramificações. Os macroconídios são grandes, claros, multiseptados, com forma de foice ou canoa, produzidos em macroconidióforos simples, ou ramificados produzidos geralmente em esporodóquios.

Segundo Araújo et al. (2010), estas características macro e micromorfológicas sugerem que os isolados T3/M1 09 e T3/M2 05 pertencem possivelmente ao gênero *Fusarium* sp.

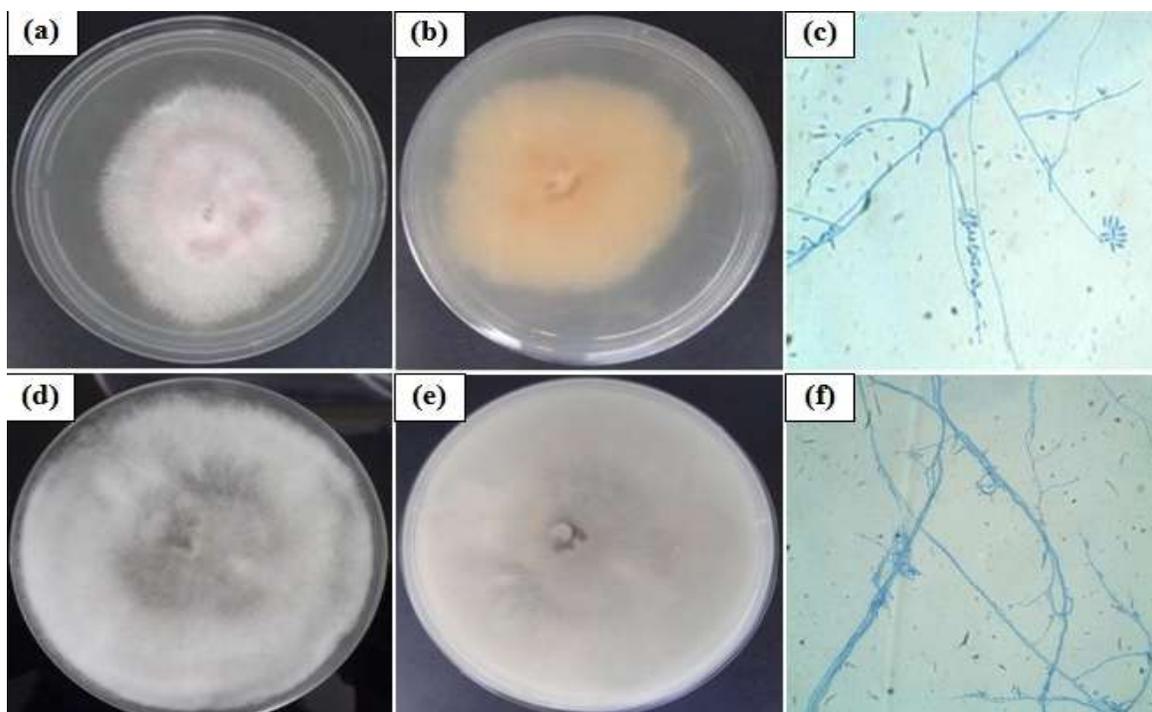


Figura 18. Isolados de *Fusarium* spp: Isolado T3/M1 09: morfologia micelial (a); morfologia reversa (b); micromorfologia em 400X (c). Isolado T3/M2 05: morfologia micelial (d); morfologia reversa (e); micromorfologia em 400 X (f).

Os fungos T3/M2 20 e T4/M2 12, apresentam como característica macromorfológica, colônia inicialmente branca aveludada, tornando-se verde pulverulenta, podendo apresentar borda branca (Figura 19 a, d). O fundo pode ser branco, marrom amarelado ou vermelho (Figura 19 b, e). Como características microscópicas observam-se hifas septadas, apresentando conidióforos simples ou ramificados (com ramos secundários denominados métulas) (Figura 19 c, f). As fiálides são pouco alongadas e apresentam conídios globosos ou ovais, de coloração esverdeada reunidos em cadeias pequenas. Segundo Araújo et al. (2010), estas características macro e micromorfológicas sugerem que o isolado T3/M2 20 pertence ao gênero *Penicillium* sp.

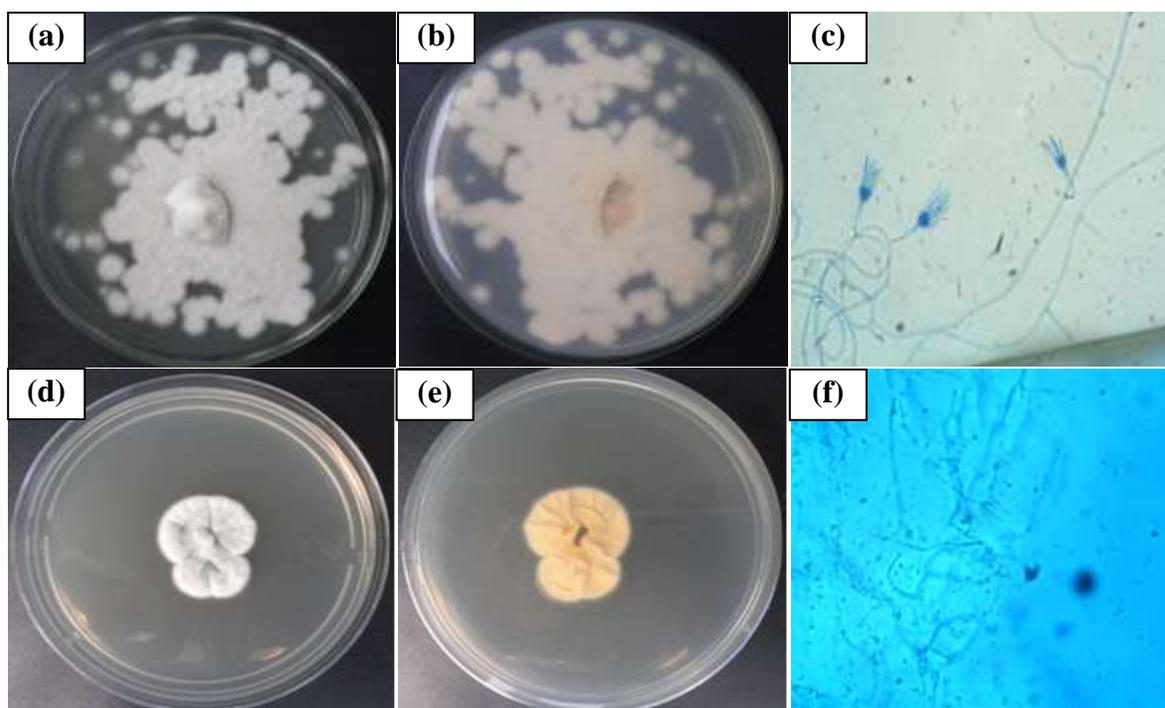


Figura 19. Isolados de *Penicillium* spp.: Isolado T3/M2 20: morfologia micelial (a); morfologia reversa (b); micromorfologia em 400X (c). Isolado T4/M2 12: morfologia micelial (d); morfologia reversa (e); micromorfologia em 400X (f).

O fungo T4/M2 03 apresenta como característica macromorfológica colônia de crescimento lento, pulverulenta a aveludada, de coloração verde oliva, verde acinzentado, marrom ou preta com fundo usualmente preto (Figuras 20a e 20b). Como característica microscópica observa-se hifa septada escura (dematiáceas) com conidióforos eretos. Os conidióforos produzem cadeias longas de conídios (Figura 20c). Os conídios geralmente são elípticos a cilíndricos, unicelulares ou bicelulares, com coloração hialina à marrom. As cadeias de conídios são muito frágeis, desarticulando-se facilmente durante o preparo do material para microscopia óptica. Segundo Araújo et al. (2010), estas características macro e micromorfológicas sugerem que o isolado T4/M2 03 pertence ao gênero *Cladosporium* sp.

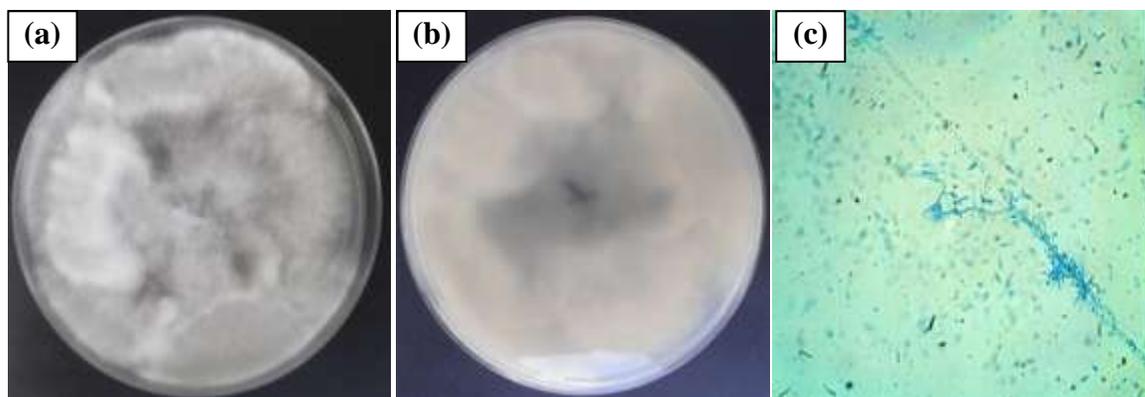


Figura 20. Isolado de *Cladosporium* spp.: Isolado T4/M2 03: morfologia micelial (a); morfologia reversa (b); micromorfologia em 400X (c).

O fungo T4/M4 09 apresenta como característica macro-morfológica colônia pulverulenta aveludada à cottonosa. Inicialmente branca, adquirindo coloração amarelada, verde, marrom ou preta, dependente da espécie (Figura 21a). Fundo normalmente marrom, branco ou dourado (Figura 21b). Como características microscópicas observam-se presença de conidióforos eretos sem ramificações, originados de uma célula pé e terminando em uma vesícula globosa da qual surgem fiálides em forma de garrafa. As fiálides produzem uma cadeia de esporos globosos unicelulares (Figura 21c). Portanto, segundo Araújo et al. (2010), estas características macro e micromorfológicas sugerem que o isolado T4/M4 09 pertence ao gênero *Aspergillus* sp.

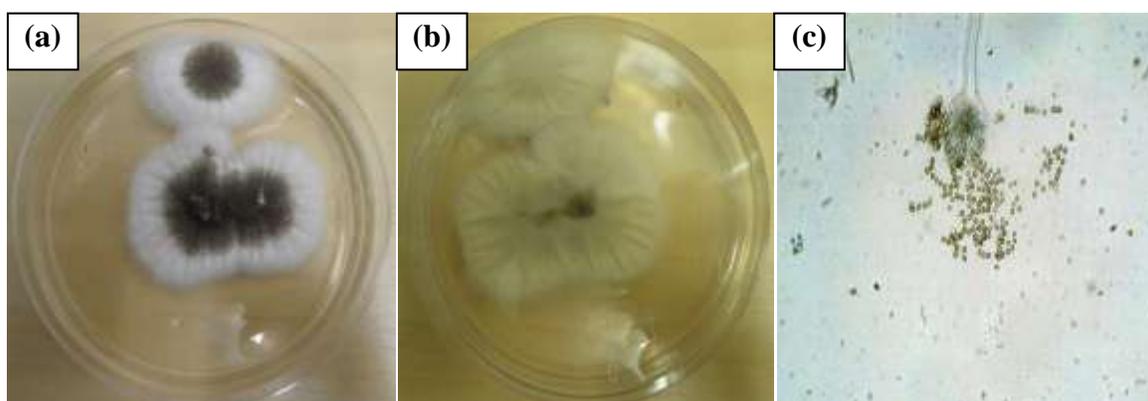


Figura 21. Isolado de *Aspergillus* spp.: Isolado T4/M4 09: morfologia micelial (a); morfologia reversa (b); micromorfologia em 400X (c).

Os isolados ilustrados nas Figuras 22, 23 e 24 não foram identificados quanto ao gênero, uma vez que suas características micromorfológicas foram inconclusivas.

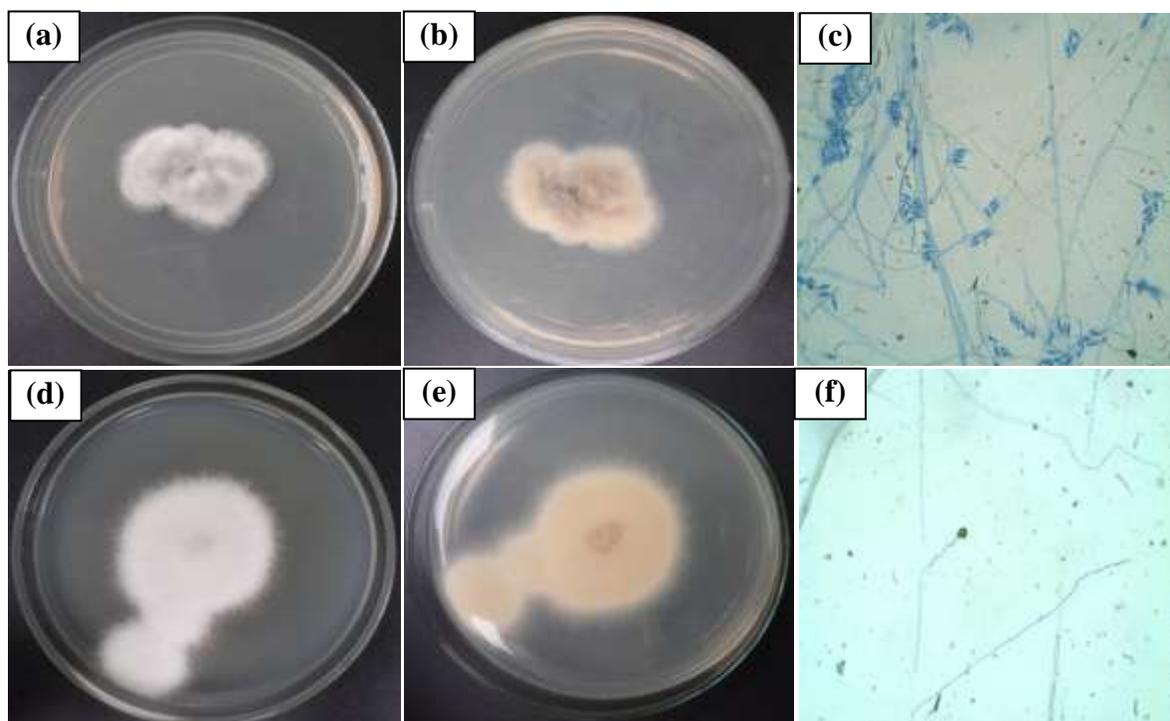


Figura 22. Isolados T3/M2 01 (ilustrações no plano superior) e T3/M3 02 (ilustrações do plano inferior): morfologia micelial (a, d); morfologia reversa (b, e); micromorfologia em 400X, ilustrando a presença de apressório em f (c, f).

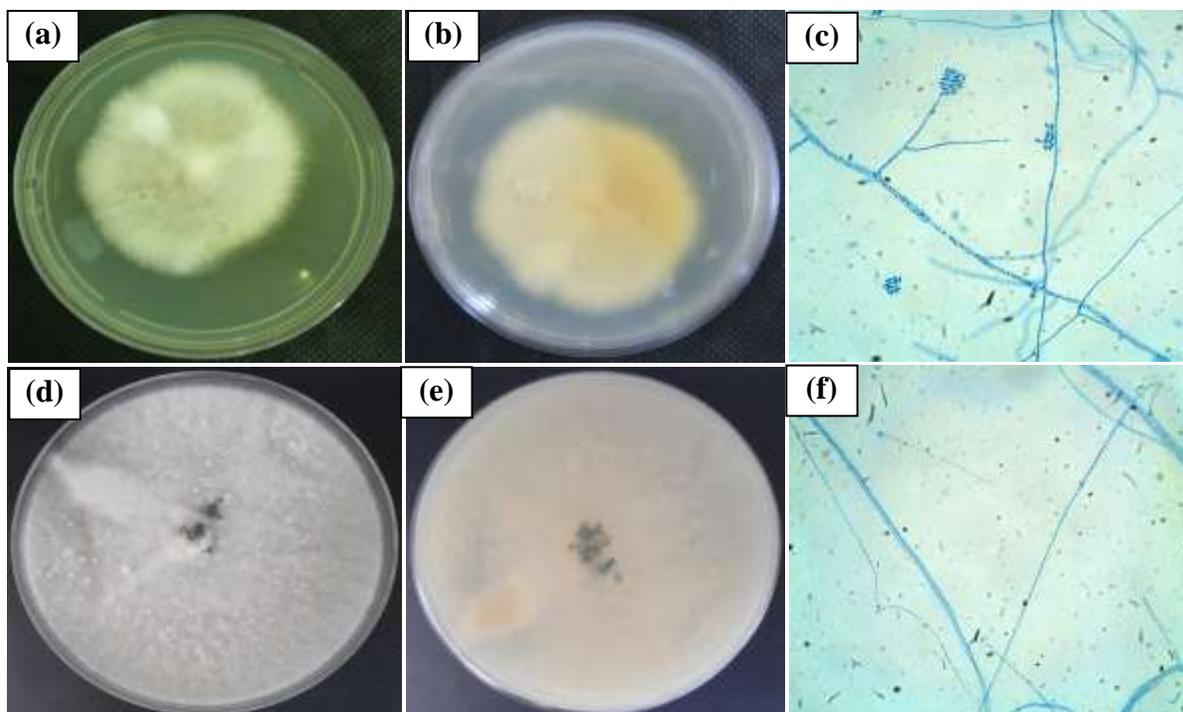


Figura 23. Isolados T4/M2 01 (ilustrações no plano superior) e T4/M3 11 (ilustrações do plano inferior): morfologia micelial (a, d); morfologia reversa (b, e); micromorfologia em 400X, ilustrando a ausência de conídios em f (*Mycelia sterilia*) (c, f).

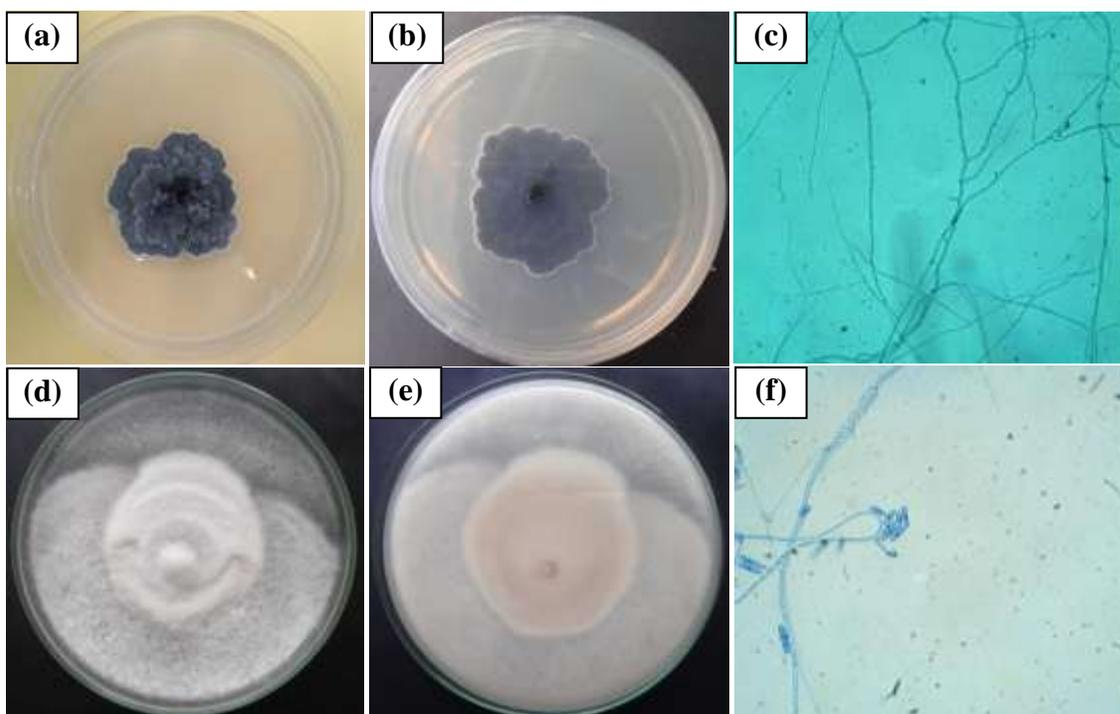


Figura 24. Isolados T3/M4 04 (ilustrações no plano superior) e T3/M4 05 (ilustrações do plano inferior): morfologia micelial (a, d); morfologia reversa (b, e); micromorfologia em 400X, ilustrando a ausência de conídios (*Mycelia sterilia*) (c, f).

A caracterização macro e micromorfológica dos isolados de pau-rosa possibilitou a identificação de quatro gêneros fúngicos (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Fusarium*), os quais são reportados como fitopatógenos de diversas culturas agrícolas já citadas anteriormente. Alguns fungos não foram identificados devido às dificuldades na caracterização taxonômica dos isolados, visto que há uma infinidade de espécies e gêneros, o que prejudica a realização deste trabalho.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *M. guianensis*

A Tabela 4 apresenta os resultados da avaliação da atividade antifúngica dos meios metabólicos dos fungos endofíticos de *M. guianensis* frente aos fungos isolados de pau-rosa e fitopatógenos do arroz e da melancia. Os fungos endofíticos de *M. guianensis* não inibiram os fungos fitopatógenos isolados do pau-rosa, T3/M1 09, T3/M4 04, T4/M4 09,

T3/M3 08, T3/M4 12 e T3/M2 20 em todas as condições testadas, e portanto não foram incluídos na Tabela 3.

Dos meios metabólicos secundários dos 40 fungos endofíticos testados frente às linhagens fúngicas fitopatogênicas, 25% apresentaram resultado positivo frente a pelo menos uma linhagem. No entanto, nenhum dos metabólitos apresentou atividade frente às cepas de *Pyricularia grisea* e *Didymella bryoniae*. Dentre os dez metabólitos com atividade, os mais promissores, ou seja, que inibiram um maior número de fungos foram os extratos obtidos do isolado **Mg C2.3.2** que inibiu os fungos fitopatogênicos T3/M3 02, T3/M4 05, T3/M2 01, T4/M2 12 e T3/M2 05, ambos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*, respectivamente; e do isolado **Mg F 3.3.1 B** que inibiu o crescimento dos fungos T3/M3 02, T3/M4 05, T4/M2 01, T3/M2 01 e T4/M2 12 do gênero *Penicillium*, ambos extratos obtidos de isolados endofíticos do gênero *Phomopsis* sp.. O extrato do isolado **MgC 2.3.2 B**, um *Penicillium* sp., inibiu quatro fungos isolados do pau-rosa T3/M4 05, T4/M3 11, T3/M2 05 e T4/M2 03, estes últimos pertencentes aos gêneros *Fusarium* e *Cladosporium*, respectivamente.

O gênero *Phomopsis* vem sendo relatado como uma fonte rica de metabólitos bioativos, tais como compostos com ação antimalárica, antituberculose, antifúngica, entre outras (RUKACHAISIRIKUL et al., 2008). Em um estudo realizado por Silva et al. (2005) a espécie endofítica *P. cassiae* isolada de *Cassia spectabilis*, levou ao isolamento de dois novos metabólitos, um benzoato e uma phomopsilactona, sendo que ambos apresentaram atividade contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Corrado e Rodrigues (2004) isolaram das folhas e galhos de *Aspidosperma tomentosum* e *Spondias mombin*, 13 cepas endofíticas do gênero *Phomopsis* sp.. Os extratos das mesmas foram testadas frente os microrganismos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *A. niger* e *F. oxysporum*, sendo que três dos treze extratos inibiram efetivamente o crescimento de todas as cepas-teste. Tais resultados indicam que tal gênero possui um enorme potencial na produção de moléculas biotivas com aplicação farmacêutica e agrícola.

Tabela 4. Resultado dos testes antifúngicos realizados com o meio metabólico líquido dos fungos endofíticos isolados de *M. guianensis*.

FUNGOS FITOPATOGÊNICOS											
Nº	Extrato <i>M. guianensis</i>	Pg	Db	T3/M3 02	T4/M2 12	T4/M3 11	T3/M2 05	T3/M4 05	T4/M2 03	T4/M2 01	T3/M2 01
1	Mg F2 2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Mg R2 2.2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
3	Mg F1 3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Mg F3 3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Mg C1 3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Mg F3 3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Mg F2 3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Mg C1 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Mg F2 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Mg F2 1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Mg Ce2 2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Mg F2 1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Mg Ce3 3.1A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
14	Mg Ce1 3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Mg C2 3.2	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
16	Mg Re1 1.1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
17	Mg F1 2.1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
18	Mg F3.3 1B	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
19	Mg F3.3 1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Mg Re1 3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Mg C3 2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Mg C2 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Mg Re2 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Mg C1 2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Mg F2 3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Mg Re3 3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Mg Ce3 3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Mg Ce2 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Mg Ce2 2.3B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Mg R2 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Mg F1 2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Mg C2 3.2B	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
33	Mg R1 1.2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
34	Mg Re1 3.2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
35	Mg C2 3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	Mg F2 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Mg Ce3 2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Mg Re3 1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	Mg F1 3.2A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	Mg F1 3.2B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle negativo		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) ausência de atividade;

(+) atividade inibitória

Pg = *Pyricularia grisea*

Db = *Didymella bryoniae*

Redko et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Erythrina crista galli* (hospedeiro vegetal) e dos extratos do fungo endofítico *Phomopsis sp.* isolado da planta. O extrato de acetona de ramos jovens de *Erythrina crista-galli* inibiu o crescimento de *Bacillus brevis* e *B. subtilis*. O extrato de *Phomopsis sp.* foi também ativo contra esses microrganismos e também contra *Micrococcus luteus*, *Enterobacter dissolvens*, *Nematospora coryli*, *Penicillium notatum* e *Paecilomyces variotti*.

Os metabólitos produzidos pelo fungo **Mg R2 2.2** do gênero *Pestalotiopsis* apresentaram atividade frente a três isolados: T3/M2 05 (*Fusarium sp.*), T4/M2 03 (*Cladosporium sp.*) e T3/M4 05 (gênero não identificado). Algumas das espécies de *Pestalotiopsis* têm chamado muita atenção por produzir metabólitos secundários importantes, como o diterpenóide taxol, uma importante droga anticancerígena produzida por *P. guepinii* isolado de *Wollemia nobilis*, assim como atividades do tipo fitotóxicas, antioxidantes e antifúngicas (SANTOS et al., 2008).

O endófito *Pestalotiopsis microspora*, isolado da árvore *Torreya taxifolia*, produz vários compostos com propriedades antifúngicas, incluindo pestalosite, pestalopirona e hidroxipestalopirona (LEE et al., 1996). Li et al. (2001) destacaram a produção de ácido ambuico, um agente antifúngico, produzido por *P. microspora* com atividade frente aos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani*, *F. cubense*, *Pythium ultimum*, *Diplodia natalensis* e *Cephalosporium gramineum*.

Há relatos na literatura de que *P. jesteri*, endófito isolado de *Fragaria bodenii*, produz duas substâncias (jesterona e hidroxijesterona) com atividades antifúngicas frente aos fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pyricularia oryzae*, entre outros, demonstrando sua potencial utilização no controle biológico desses microrganismos (LI e STROBEL, 2001). Um estudo sobre diversidade genética e antifúngica do endófito *Pestalotiopsis sp.* isolado de plantas medicinais revelou que 62,5% dos endófitos inibiu o crescimento dos fungos patogênicos das espécies *Alternaria carthami*, *Fusarium verticilloides*, *Phoma sorghina*, *Terminalia chebula*, *Azadirachta indica* e *Holarrhena antidysenterica* (TEJESVI et al., 2007). Tais trabalhos demonstram que os fungos endofíticos do gênero *Pestalotiopsis* são potenciais produtores de moléculas bioativas, como os antifúngicos, dados estes que ressaltam os resultados obtidos neste projeto, visto as similaridades dos mesmos.

Rodrigues et al. (2000), isolaram compostos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* isolados de *Spondias mombin*. A atividade dos endófitos foi testada contra 14 microrganismos, incluindo actinomicetos, bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos. O fungo *Guignardia* sp. inibiu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Penicillium canadensis*. *P. guepinii* apresentou atividade contra *S. cerevisiae*, enquanto que *Phomopsis* sp. apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*. Tais estudos obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, o que aumenta a possibilidade de isolarmos um composto com atividade antifúngica que possa ser utilizada no controle de patógenos. Ressalta-se ainda que o gênero *Fusarium* é um importante fitopatógeno pois acomete culturas economicamente importantes, causando enormes prejuízos econômicos aos países produtores de alimento como o Brasil.

Um estudo realizado por Ethur et al. (2007), corrobora com o resultado obtido neste trabalho. Os autores reportam que *Penicillium claviforme* demonstrou atividade antifúngica frente a *Fusarium solani* e *F. oxysporum*, fitopatógenos habitantes do solo causadores de podridões de raiz e murchas, respectivamente.

O fungo endofítico *Penicillium frequentans* isolado de *Picea glehnii* produziu ácido penicílico com atividade antifúngica frente a *Pythium vexans*, o que demonstra sua potencial utilização como agente de controle biológico (YAMAJI et al., 2005).

Observou-se, em geral, que os metabólitos de endófitos de *M. guianensis* que apresentaram atividade antifúngica, podem ser utilizados no controle biológico frente os fitopatógenos de pau-rosa, considerando os diversos trabalhos reportados na literatura que confirmam a produção de metabólitos antifúngicos produzidos por esses grupos.

4.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os ácidos nucléicos dos fungos fitopatogênicos foram extraídos, considerando-se os isolados inicialmente, bem como os re-isolados, após inoculação em planta sadia. Embora, em quatro amostras a detecção dos ácidos nucléicos tenha sido pouco evidente, reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando *primers* de ITS (*internal transcribed*

spacers) foram positivos para essas amostras, as quais foram utilizadas sem diluição. As análises moleculares estão em andamento e devido à presença de bandas inespecíficas nos géis de ITS, os dados não estão sendo ilustrados no presente trabalho.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1) O isolamento dos fungos fitopatogênicos se mostrou eficiente, pois foram isolados 16 fungos a partir de folhas de mudas de pau-rosa que apresentavam sintomas de infecção fúngica (manchas foliares).

2) Os fungos isolados, após a caracterização macro e micromorfológica foram identificados como pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Estes fungos são amplamente reportados na literatura como fitopatógenos de diversas culturas agrícolas, causadores de perdas consideráveis para a economia do País.

3) Quanto à avaliação dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados de *M. guianensis*, pode-se concluir que os resultados obtidos foram satisfatórios, tendo em vista que, 25% dos 40 caldos metabólitos testados apresentaram atividade frente à maioria dos microrganismos fitopatogênicos, incluindo os patógenos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Porém frente às cepas padrão de *Pyricularia grisea* e *Didymella bryoniae*, fitopatógenos do arroz e da melancia, respectivamente, nenhum dos meios metabólitos apresentou tal capacidade.

4) Os extratos mais promissores em relação à atividade antifúngica foram **Mg C2.3.2** e **Mg F 3.3.1 B**, ambos pertencentes ao gênero *Phomopsis*. Tais extratos inibiram cinco dos 16 fungos isolados de pau-rosa, demonstrando a capacidade deste gênero em produzir moléculas antifúngicas, corroborada em vários outros trabalhos citados anteriormente.

5) A patogenicidade do fungo *Fusarium* sp. em *Aniba rosaeodora* Ducke foi confirmada a partir da realização do Postulado de Koch, onde o fungo T3/M1 09 isolado de mudas de pau-rosa foi inoculado em mudas saudáveis, sendo re-isolado o fungo M3/R2 06, o qual, após caracterização micro e macromorfológica, foi identificado como pertencente a este gênero.

6 PERSPECTIVAS

Para a continuidade deste trabalho, sugere-se o desenvolvimento das seguintes etapas:

1) Realizar, por meio de técnicas moleculares i) a análise de identidade dos fungos, os quais terão as regiões ITS amplificadas, purificadas e seqüenciadas e posteriormente, comparadas com seqüências depositadas no GenBank; ii) a comparação de perfis eletroforéticos dos fungos isolados e re-isolados, a fim de confirmar se as espécies isoladas foram responsáveis pelos sintomas observados nas mudas sadias após a inoculação fúngica.

2) Realizar o fracionamento dos meios metabólicos que apresentaram atividade antifúngica utilizando solventes de diferentes polaridades, a fim de isolar o(s) composto(s) com atividade antifúngica.

3) Caracterizar ao menos um dos metabólitos com atividade inibitória sobre o crescimento dos fitopatógenos de pau-rosa por meio de técnicas analíticas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN ^1H) e a Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (CG-MS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. Burlington, MA: Elsevier Academic, Ed. 5. 922p. 2005.
- AGUIN, O., MANSILLA, J. P., SAINZ, M. J. *In vitro* selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root of grapevine in the field. *Pest Management Science*. 62: 223–228, 2006.
- ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. L.; JUNIOR, V. F. V. Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. *Química Nova*. 33(1): 141-145. 2010.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. Ed. 4, New York: John Wiley, 869p. 1996.
- ALTERTHUM, M. F. *Elementos de microbiologia*. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biologia Industrial*. Editora Blucher. 1: 254. 2001.
- ALVES, F. M.; ISHII, I. H. Lauraceae no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rodriguésia*. 58(1): 179-192. 2007.
- ALVES, L. F. A.; GASSEN, F. G. S.; PINTO, P. M. O. J.; NEVES, S. B.; ALVES, M. G. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviários comerciais de Cascavel, PR. *Neotropical Entomology*. 34: 507-510. 2005.
- ARAÚJO, W.L. et al. Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos. Piracicaba, CALO, 167p. 2010.
- ARNOLD, A. E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26: 15649-15654. 2003.
- AUER, C.G.; KRUGNER, T.L. Influência do solo na incidência de cancro em *Eucalyptus grandis*. *Boletim de Pesquisa Florestal*. 34: 65-73. 1997.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. *Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects*. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. *Fungi: multifaceted microbes*. 189-207. 2007.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3: 40-65. 2000.

BANHOS, E.F. *Atividade antimicrobiana de Myrcia guianensis (Myrtaceae) e de seus fungos endofíticos*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) –Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 100 f. 2011.

BARBOSA, M.A.G.; REHN, K.G.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32(2): 98-104. 2001.

BASHYAL, B. P.; WIJERATNE, E. M. K.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. L. Globosumones A-C, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert Endophytic Fungus *Chaetomium globosum*. *Journal of Natural Products*.68: 724-728. 2005.

BATISTA-JUNIOR, C. B. et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37(8): 1189-1194. 2002.

BATISTA, T. F. C.; ALVES, K. F.; SANTOS-FILHO, B. G.; RODRIGUES, R. C.; OLIVEIRA, F. C.; TAVARES, A. E. B. Ocorrência de fungos e nematóides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari (AM). *Revista de Ciências Agrárias*. (47): 163-171. 2007.

BOTELHO, R.V. Tratamento pós-colheita de maçãs com quitosana para controle de *Penicillium* sp. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 4(2): 117-120. 2009.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products*. 63(10):1447-1448. 2000.

BRADY, S. F.; BONDI, S. M.; CLARDY, J. The guanacastepenes: a highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. *Journal of the American Chemical Society*. 123: 9900-9901. 2001.

BROGLIO, M. S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; PEREIRA, B. J. L. Ação de alguns produtos fitossanitários para adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ciência Agrotécnica*. 30: 1051-1055. 2006.

CAFÊU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.S.; ARAÚJO, A.R. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova*. 28(6): 991-995. 2005.

CALDAS, G. M. M.; OLIVEIRA, R. C.; TESSMANN, D. J.; JUNIOR, M. M. Ocorrência de patulina em uva fina (*Vitis vinifera* L. cv. “Rubi”) com sinais de podridão ácida. *Ciência Rural*. 38(1): 14-18. 2008.

CAMARGO, R. B.; PEIXOTO, A. R.; TERAPO, D.; ONO, E. O.;CAVALCANTI, L. S. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. *Revista Caatinga*. 24(1): 15-19. 2011.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*. 33(3): 215-221. 2007.

CASTELLANI, A. Viability of mold culture of fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. 42: 225. 1939.

CESA, L.P.; JESUS JÚNIOR, W.C.; BOGO, A.; LAZAROTO, A.; SILVA, A.; AMARANTE, C.V.T. Análise Temporal da Sarna da Macieira nas Cultivares Royal Gala e Fuji sob os Sistemas Convencional e Orgânico de Produção. *Fitopatologia Brasileira*. 31: 585-591. 2006.

CHAVARRIA, et al. Incidência de doenças e necessidade de controle em cultivo protegido de videira. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 29(3): 477-482. 2007.

CHITARRA, L.Z.; GOULART, A.C.P.; ZORATO, M.F. Tratamento de sementes de algodoeiro com fungicidas no controle de patógenos causadores de tombamento de plântulas. *Revista Brasileira de Sementes*. 31(1): 168-176. 2008.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: *The American Phytopathological Society*, 539 p. 1993.

CORNELIO, V. M. O., SOARES, A. A.; FILHO, J. S. S. B. S.; SOARES, P. C. Identificação de raças fisiológicas de *Pyricularia grisea* em arroz no estado de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*. 27(5): 1016-1022. 2003.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*. 44(2): 157-160. 2004.

COUTINHO, D. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BASÍLIO, I. J. L. D. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroidae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16(2): 176-184. 2006.

DEBBAB ET AL. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. *Journal of Natural Products*. 72(4): 626-631. 2009.

DING, G.; LIU, S.; GUO, L.; ZHOU, Y.; CHE, Y. Antifungal Metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan*. *Journal of Natural Products*. 71(4): 615-618. 2008.

EBEL, R.; ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; KOZYTSKA, S.; HENTSCHEL, U.; PROKSCH, P. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry*. 69: 1716-1725. 2008.

ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 510p. 2004.

ETHUR, L. Z., BLUME, E., MUNIZ, M., DA SILVA, A. C. F., STEFANELO, D. R.; DA ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia Brasileira*. 30: 127-133. 2005.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; FLORES, M. G. V. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. *Ciência Rural*. 37(6): 1794-1797. 2007.

FAHEY, J. W. *Endophytic Bacteria for the Delivery of Agrochemicals to Plants*. In: Curtler H.O. Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agricultures. American Chemical Society Symposium.120-128. 1988.

FAO-FAOSTAT. *Situação da produção e área de hortaliças no Brasil*. 2002.

FERRAZ, J. B. S.; BARATA, L. E. S.; SAMPAIO, P. T.; GUIMARÃES, G. P. Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. *Ciência e Cultura*. 61(3):40-43. 2009.

FIGUEIREDO, M. L. C.; CRUZ, I.; DELLA, L.; TEREZINHA, M. C. Controle integrado de *Spodoptera frugiperda* (Smith e Abbott) utilizando-se o parasitóide *Telenomus remus nixon*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 34: 1975-1982. 1999.

FLETCHER, J. et al. Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70: 450-471. 2006.

GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R.; GOMES, V.N. Fungos Associados com o Declínio e Morte de Videiras no Estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*. 29: 322-324. 2004.

GUALBERTO, R.; RESENDE, F. V.; LOSSASSO, P. H. L. Produtividade e qualidade do melão rendilhado em ambiente protegido, em função do espaçamento e sistema de condução. *Horticultura Brasileira*. 19(3): 240-243.2001.

GUIMARAES, L.G.L; CARDOSO, M.G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S.S. Atividades antioxidante e fungitoxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agrônômica*. 42(2): 464-472.2011.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of their Occurrence. *Journal of Natural Products*. 69(3): 509-526. 2006.

HALLMANN, J., SIKORA, R. A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 102:155-162. 1996.

HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; SOBERANIS, W.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control*. 50: 143–149. 2009.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazonica*. 35(1): 29-33. 2005.

HOFFMAN, A. M.; MAYER, S. G.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; SOVOCOL, G. W.; GRANGE, A. H.; KELLEY-SWIFT E. G. Purification, identification and activity of phomodione, a furrandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochemistry*. 69: 1049-1056. 2008.

HOMMA, A. K. O. *O extrativismo do óleo essencial de pau-rosa na Amazônia*. XLIII Congresso da Sober. Ribeirão Preto – SP. 2005.

HORST, K. *Westcott's Plant Disease Handbook*. Springer, Berlin Heidelberg: New York, Ed. 7. 2008.

HUSSEIN, H. M.; CHRISTENSEN, M. J.; BAXTER, M. Occurrence and distribution of *Fusarium* species in maize fields in New Zealand. *Mycopathologia*. 156: 25–30. 2002.

IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Portaria nº 037/92-N: lista oficial de espécies de flora brasileira ameaçadas de extinção. Brasília, Brasil. 1992.

ILTCHENCO, J.; FONTANA, V.; ANGONESE, M.T.; SARTORI, V.C.; RIBEIRO, R.T. Atividade fungistática “*in vitro*” de extratos etanólicos sobre *Alternaria solani* e *Fusarium oxysporum*. *Cadernos de Agroecologia*. 5(1): 1-5. 2010.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.V.; PEREIRA, M.; LIMA, M.M.; CHAVES, R.C. *Doenças da goiabeira no cerrado*. Embrapa, Cerrados. 32p. 2001.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 358-363. 2006.

KROPF, M.; QUINET, A.; ANDREATA, R. Lista anotada, distribuição e conservação das espécies de Lauraceae das restingas Fluminenses, Brasil. *Pesquisas Botânicas*. 57: 161-180. 2006.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS- VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. São Paulo: Sarvier. Ed. 9. p.1104. 2002.

LI, J. Y.; STROBEL, G. A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jester*. *Phytochemistry*. 57: 261-265. 2001.

LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOSKY, E.; CLARDY, J. C. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Journal of Organic Chemistry*. 61: 3232-3233. 1996.

LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Screening for endophytic fungi with antitumor and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 1515–1519. 2005.

LI, J. Y. et al. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry*. 56(5): 463-468. 2001.

LIMA, M. J. V.; CHAAR, J. (Coords). *Avaliação silvicultural da produtividade e qualidade do óleo essencial de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) extraído de folhas e galhos de plantios de diferentes idades no município de Maués/AM*. Relatório das atividades do projeto, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 13f, 2006.

LOPES, M. A. t al. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. *Mycological Research*. 112: 399-406. 2008.

LUPE, F.; SOUZA, R.; BARATA, L. E. S. Seeking a sustainable alternative to Brazilian rosewood. *Perfumer e Flavorist*. 33: 40-43. 2008.

LUPE, F. A. *Estudos da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia*. Dissertação (Mestrado em Química. Área de concentração: Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 109 f, 2007.

MA, Y. M.; LI, Y.; LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Anti-Helicobacter pylori metabolites from *Rhizoctonia* sp. CY064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia*. 75: 451-456. 2004.

MABBERLEY, D. J. *The plant-book: a portable dictionary of the higher plants*. Cambridge: Cambridge University Press. 706-709, 1990.

MAIA, J.G.; ANDRADE, E.H.A.; COUTO, H.A.R.; SILVA, A.C.M.; MARX, F.; HENKE, C. Plant sources of Amazon rosewood oil. *Química Nova*. 30(8): 1906-1910. 2007.

MAKI, C. S. *Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)*. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 127p. 2006.

MALAVOLTA, V. M. A.; CARQUEIJO, A. de P.; MENDES, L. Variabilidade patogênica do fungo *Pyricularia grisea* no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*. 35(1): 49-51. 2009.

MALDONADO, M.C.; RUNCO, R.S.; NAVARRO, A.R. Isolation, identification and antifungal susceptibility of lemon pathogenic and non pathogenic fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*. 22: 57-59. 2005.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*. 8(1): 195-206. 2001.

MARTINS, T. D.; LAVORENTI, N. A.; URASHIMA, A. S. Comparação entre métodos de avaliação de transmissão de *Pyricularia grisea* através de sementes em triticales. *Fitopatologia Brasileira*. 29(4): 425-428. 2004.

MARTINS, M.C., LOURENÇO, S.A., GUTIERREZ, A.S.D., JACOMINO, A.P. & AMORIM, L. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*. 31: 05-10. 2006.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptomfree cotton plants. *Phytopathology*. 80: 808-811.1990.

MONTESINOS, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*. 6: 245–252. 2003.

MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*. 32: 694-698. 1976.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. *Molecular General Genetics*. 233: 1-9.1992.

NARISAWA, K.; KAWAMATA, H.; CURRAH, R. S.; HASHIBA, T. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology*. (108): 103–109. 2002.

NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, G.; STANGARLIN, J.R. Search of antibiotic metabolites from phytopathogenic fungi. *Latin American Journal of Pharmacy*. 26(5): 741-743. 2007.

OHASHI, S. T. Brazilian rosewood oil: sustainable production and oil quality management. *Perfumer e Flavorist*. 22: 1-5. 1997.

OSORIO, E.; FLORES, M.; HERNÁNDEZ, D.; VENTURA, J.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILAR, C. N. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 31:153–157. 2010.

PANDOLFI, V. *Análise transcricional do fitopatógeno Fusarium graminearum Schwabe na interação antagonista com a bactéria Pantoea agglomerans gavini*. Tese (Doutorado

em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 140p. 2006.

PANDOLFO, J.D. *Associação de Trichoderma sp. e fungicidas no controle de Fusarium oxysporum f. sp.phaseoli*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia. Área de Concentração: Fitossanidade). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 67p. 2007.

PIROVANI, et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*. 29: 2391-2401. 2008.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 19(3): 563-572. 2005.

RAY, R. C.; RAVI, V. Post harvest spoilage of sweet potato in tropics and control measures. *Critical Reviews on Food Science*. 45: 623-644. 2005.

REDKO, F.; CLAVIN, M.; WEBER, D.; ANKE, T.; MARTINO, V. Search for active metabolites of *Erythrina crista-galli* and its endophyte *Phomopsis* sp. *Molecular Medicinal Chemistry*. 10: 24-26. 2006.

RIZZO, A. A. N.; FERREIRA, M. R.; BRAZ, L. T. Ação de acibenzolar-s-methyl (BTH) isolado e em combinação com fungicidas no controle do cancro da haste em melão rendilhado. *Horticultura Brasileira*. 21(2): 238-240. 2003.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*. 40: 261-267. 2000.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches broom disease. *International Journal of Biological Sciences*. 1: 24-33. 2005.

RUKACHAISIRIKUL, V.; SOMMART, U.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J.; KERTIKARA, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*. 69: 783-787. 2008.

RUSSOMANO, O.M.R.; KRUPPA, P.C. Doenças fúngicas das plantas medicinais, aromáticas e condimentares – parte aérea. *Biológico*. 72(1): 31-37.2010.

SANKARAN, K. V.; BRIDE, P. D.; GOKULAPALAN, C. *Ganoderma* diseases of perennial crops in India—an overview. *Mycopathologia*. 159: 143–152. 2005.

SAMPAIO, P. T. B. Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). In: CLAY, J. W. et al. (Ed.). Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus, INPA/SEBRAE. 290-297. 2000

SAMPAIO, P. T. B.; SANTOS, M. C.; VIEIRA, G.; SPIRONELLO, W.; USECHE, F. L.; BRUNO, F. M. S. Avaliação da rebrota da copa das árvores de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em sistema de podas sucessivas. *Acta Amazonica*. 37(1): 55-60. 2007.

SANTOS, A. A.; CRISÓSTOMO, J. R.; CARDOSO, J. W. Avaliação de híbridos de melão quanto às principais doenças nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. *Embrapa Agroindústria Tropical*. 16:14p. 2004.

SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; REIS, A. Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 31(5): 476-482. 2006.

SANTOS, G. R.; CAFÉ-FILHO, A. C.; SABOYA, L. M. F. Controle químico do crestamento gomoso do caule da melancia. *Fitopatologia Brasileira*. 30(2): 155-163. 2005.

SANTOS, L. S. et al. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. *Planta Daninha*. 26(3): 539-548. 2008.

SEO, S. M.; KIM, J.; LEE, S. G.; SHIN, C. H.; SHIN, S. C.; PARK, I. K. Fumigant antitermitic activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*), caraway (*Carum carvi*), dill (*Anethum graveolens*), geranium (*Pelargonium graveolens*), and litsea (*Litsea cubeba*) oils against japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(15): 6596-6602. 2009.

SILVA et al. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. *Journal of Brazilian Chemistry Society*. 16(6B): 1463-1466. 2005.

SILVA, I. L. S. S. et al. Efeito de nutrientes combinados com indutores de resistência na proteção contra a vassoura-de-bruxa no cacauero. *Ciência Agrotécnica*. 32: 61-67. 2008.

SILVA, I. D.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R.; CUNHA, M. G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 35(2): 109-115. 2005.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S., SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botanica Brasilica*. 20(3): 649-655. 2006.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. *Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas*. Instituto de Botânica. Jardim Botânico de São Paulo, São Paulo, 2006.

SILVA, G.H.; OLIVEIRA, C.M.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.; ARAÚJO, A.R. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (Piperaceae). *Química Nova*. 33(10): 2038-2041. 2010.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Ed. 1. 2004.

SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S. Streptomycetes antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Ciencia Rural*. 39(6): 1897-1900. 2009.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*. 34(2): 185-195. 2004.

STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de alimentos*. 18(4): 382-385. 1998.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 260(5105): 214-216. 1993.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*. 22(4): 315-333. 2002.

SU, W.; WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*. 193; 249-253. 2000.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*. 31(7): 1807-1813. 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. 18: 448-459. 2001.

TEJESVI, M. V.; KINI, K. R.; PRAKASH, H. S.; VEN SUBBIAH; SHETTY, H. S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity*. 24: 37-54. 2007.

TIMPERIO, A.M.; D'ALESSANDRO, A.; FAGIONI, M.; MAGRO, P.; ZOLLA, L. Production of the phytoalexins trans-resveratrol and delta-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1-7. 2011.

TUNALI, B.; MARSHALL, D; ROYO, C. Antagonistic effect of endophytes against several root-rot pathogens of wheat. *Proceeding of a Seminar*. 40: 381-386. 2000.

VILA-AIUB, M.; GUNDEL, P. E.; GHERSA, C. M. Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Australian Ecology*. 30: 49-57. 2005.

VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCHE, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots on soybean. *Microbial Ecology*. 24: 305-311. 1992.

WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces sp.* and *Aspegillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 34: 51-57. 2002.

WANG, F. W.; HOU, Z. M.; WANG, C. R.; LI, P.; SHI, D. H. Bioactive metabolites from *Penicillium sp.*, an endophytic fungus residing in *Hopea hainanensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 2143–2147. 2008.

WANG, A.; MENG, F.; XU, X.; WANG, Y.; LI, J. Development of molecular markers linked to *Cladosporium fulvum* resistant gene Cf-6 in tomato by RAPD and SSR methods. *HortScience*. 42(1): 11-15. 2007.

WERFF, H. van der.; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 83(3): 419-418. 1996.

WET, J.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research*. 107 (5): 557–566. 2003.

WHITE, Jr. J. F.; MARTIN, T. I.; CABRAL, D. Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phyllplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia*. 88(2): 174-178. 1996.

YAMAJI, K.; FUKUSHI, Y.; HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S. *Penicillium frequentans* isolated from *Picea glehnii* seedling roots as a possible biological control agent against damping-off. *Ecological Research*. 20: 103-107. 2005.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*. 165: 437-449. 2010.

YUE, Q.; MILLER, C. J.; WHITE, J. F. Jr.; RICHARDSON, M. D. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epiploche festucae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 4687-4692. 2000.

ZACARONI, L.M.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; PIMENTEL, F.A.; GUIMARÃES, L.G.L.; SALGADO, A.P.S.P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*,

Fusarium oxysporum e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Amazonica*. 39(1): 193-198. 2009.

ZHU, Y.J.; AGBAYANI, R.; JACKSON, M.C.; TANG, C.S.; MOORE, P.H. Expression of the grapevine stilbene synthase gene VST1 in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. *Planta*. 220: 241–250. 2004.