

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ FERNANDO JUNG

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CITROS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
Phyllosticta citricarpa

CURITIBA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ FERNANDO JUNG

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CITROS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
*Phyllosticta citricarpa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Kava-Cordeiro

Co-Orientadora Prof.^a Dr.^a Chirlei Glienke

CURITIBA

2012



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LUIZ FERNANDO JUNG**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de maio de 2012

Professora Doutora Danyelle Stringari
UNESPAR – Membro Titular

Doutora Juliana Zanetti Ribeiro
Pós-Doutoranda - Dep. Fitotecnia e Fitossanitarismo/UFPR – Membro Titular

Professora Doutora Chirlei Glienke
Dep. Genética/UFPR – Co-Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e a todos os professores do Departamento de Genética da UFPR por contribuírem para a minha formação.

Agradeço à professora Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro por ter me recebido na instituição e tornado o mestrado possível.

À Dr^a Danyelli Stringari pela colaboração e disposição durante o desenvolvimento do trabalho.

À professora Dr^a Chirlei Glienke por ter me orientado durante parte do curso e à professora Dr^a Lygia Vitória Galli-Terasawa por todo o apoio.

A todos os colegas que convivi o dia a dia e com quem aprendi muito, em especial ao Yuri Hokama, Douglas Adamoski e Vivian Szilagyi e Rayana de Oliveira;

Aos jovens estudantes Vanessa Zulkievicz, Alan Torques, Camila Senkiv, Poliana Mazur, Pâmela Oliveira e Devânia Patricia de Jesus;

A Dr^a Juliana Zanetti pelo esclarecimentos das dúvidas;

Às doutorandas Lisandra, Daiani, Angela, Josiele, Juliana Marta e a todos que participaram do meu convívio nestes dois anos de curso.

Ao meu amigo Jeferson Vieira pela motivação e cooperação;

Ao Eduardo Goulin pelo auxílio nos experimentos;

A minha mãe Margarida pelo apoio e incentivo;

A minha companheira Priscilla pelo carinho, companhia e compreensão.

Um agradecimento especial ao Maicon e à Ana pela dedicação, simpatia e colaboração durante todo o curso.

Aos colegas de disciplinas e a todos que de alguma forma participaram da minha formação.

À CAPES, CNPQ, Fundação Araucária e ao Fundecitrus pelo suporte financeiro e ao projeto REUNI pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

A citricultura brasileira é responsável por grande parte da produção mundial de citros. Entre as doenças que acometem a produção destaca-se a Mancha Preta dos Citros (MPC). Esta patologia vegetal de difícil controle é provocada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa. Apesar de não deteriorar o conteúdo interno, o patógeno induz o aparecimento de lesões na casca do fruto, o que acarreta recusa para o comércio *in natura* e em casos mais severos promove a queda prematura dos frutos, reduzindo a produtividade. Restrições fitossanitárias impostas pelos países importadores acarretam a rejeição de cargas inteiras de frutos com sintomas, ocasionando grandes prejuízos aos países produtores. Devido aos problemas ambientais e de saúde, muitos fungicidas utilizados na agricultura vem sendo removidos do mercado, o que cria uma necessidade da substituição alternativa destes agroquímicos para o controle de pragas e patógenos. Neste contexto, a utilização de microrganismos no controle biológico e na bioprospecção de produtos naturais aparece como uma ciência promissora. Microrganismos endofíticos tem se destacado pelo crescente número de novos compostos bioativos obtidos a partir do seu estudo. O uso de microrganismos endofíticos isolados de citros com ação antagonista a *P. citricarpa* possui oportuno potencial na bioprospecção de compostos para o controle da MPC. Fungos endofíticos de citros foram testados em laboratório quanto ao antagonismo à *P. citricarpa*. De 68 morfotipos isolados, 6 apresentaram-se promissores em teste de cultura pareada. Em teste de metabólitos voláteis, o isolado LGMF1254 apresentou os melhores resultados. Este fungo foi capaz de causar inibição no diâmetro de colônia de *P. citricarpa* em 60%, pela produção de metabólitos voláteis. Os voláteis deste fungo também inibiram em 100% a formação de picnídios do fitopatógeno em ensaio com folhas cítricas. Em testes com frutos cítricos em condições controladas, os voláteis não inibiram o aparecimento de lesões em frutos oriundos de regiões com alta incidência da doença. Por outro lado, em teste com indução de lesões em frutos cítricos em condições controladas, houve diminuição em 26% no diâmetro médio das lesões de MPC. Tal resultado é de grande importância uma vez que a exposição de frutos pós-colheita a um composto volátil é de fácil operacionalização, especialmente em frutos destinados a exportação. Este é o primeiro relato de um composto volátil produzido por um fungo endofítico de citros com ação antagonista a *Phyllosticta citricarpa*.

Palavras chave: *Phyllosticta citricarpa*, metabólitos voláteis, Mancha Preta dos Citros, antagonismo

ABSTRACT

The Brazilian citrus industry is responsible for much of the world production of citrus. Among the diseases affecting this production, there is the Citrus Black Spot (CBS). This plant pathology, which is difficult to control, is caused by the fungus *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa. Although there is no damage in the internal contents, the pathogen induces the appearance of lesions on the fruit skin, which leads to refusal to trade *in natura*, and in severe cases promotes the premature fall of fruit, reducing productivity. Phytosanitary restrictions imposed by importing countries lead to the rejection of entire loads of fruit with symptoms, causing great losses to producing countries. Due to environmental and health problems, many fungicides used in agriculture have been removed from the market, which generates a necessity of alternative replacement of chemicals to control pests and pathogens. In this context, the use of microorganisms for the biological control and biopanning of natural products appears as a promising science. Endophytic microorganisms have been highlighted by the growing number of new bioactive compounds obtained from these studies. The use of endophytic microorganisms isolated from citrus with antagonistic action against *P. citricarpa* has appropriate potential of biopanning of the compounds for the control of the CBS. Endophytic fungi isolated from citrus were tested in the laboratory on the antagonism to *P. citricarpa*. Of 68 endophytic fungi isolated from citrus, 6 showed to be promising in paired culture test. In test of volatile metabolites, the isolate LGMF1254 showed the best results. This fungus was able to cause inhibition in colony diameter of *P. citricarpa* by 60%, by the production of volatile metabolites. The volatiles of this fungus also inhibited by 100% the formation of pycnidia of the pathogen in citrus leaves essays. In tests with citrus fruit under controlled conditions, the volatiles did not inhibit the appearance of lesions on fruit from regions with high incidence of the disease. On the other hand, in test with lesion induction in citrus under controlled conditions there was 26% decrease of mean diameter of lesions of the CBS. This result is of great importance, since the exposure of postharvest the volatile compound is an easy operation, particularly in fruit intended for export. This is the first report of an endophytic fungal volatile compound with the antagonist action against *Phyllosticta citricarpa*.

Keywords: *Phyllosticta citricarpa*, volatile compounds, Citrus Black Spot, antagonism

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	SINTOMAS DA MANCHA PRETA EM FRUTOS	19
FIGURA 2	METODOLOGIA PARA O TESTE DE FORMAÇÃO DE LESÕES INDUZIDAS EM FRUTOS.....	36
FIGURA 3	INFLUÊNCIA DO COMPOSTO VOLÁTIL PRODUZIDO PELO ISOLADO LGMF1254 NO DESENVOLVIMENTO DE PICNÍDIOS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> EM FOLHAS DE CITROS	37
FIGURA 4	ORGANIZAÇÃO DOS FRUTOS E INÓCULOS PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ISOLADO LGMF1254 NA FORMAÇÃO DE LESÕES EM FRUTOS DE REGIÕES COM ALTO ÍNDICE DA MANCHA PRETA DO CITROS..	38
FIGURA 5	CULTURA PAREADA	40
FIGURA 6	MORFOLOGIA DAS COLONIAS E ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DOS ISOLADOS	44
FIGURA 7	TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS.....	50
FIGURA 8	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1- 5.8S-ITS2 DO rDNA DO ISOLADO LGMF1254.....	53
FIGURA 9	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA DO ISOLADO 1075.....	54
FIGURA 10	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA DO ISOLADO 07.....	55

FIGURA 11	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA DO ISOLADO 23.....	55
FIGURA 12	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA DO ISOLADO 45.....	56
FIGURA 13	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA DO ISOLADO 14.....	57
FIGURA 14	TESTE DE INIBIÇÃO NO CRESCIMENTO DE <i>P. citricarpa</i> FRENTE AOS METABÓLITOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254	60
FIGURA 15	LESÕES INDUZIDAS EM FRUTOS.....	62
FIGURA 16	EFEITO DOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254 EM FOLHAS DE CITROS INOCULADAS COM <i>P. citricarpa</i>	64
FIGURA 17	EFEITO DOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254 NO DESENVOLVIMENTO DE PICNÍDIOS DE <i>P. citricarpa</i> EM FOLHAS.....	65
FIGURA 18	ASPECTO DAS FOLHAS DE CITROS APÓS 14 DIAS DE TRATAMENTO E NA AUSÊNCIA DO TRATAMENTO COM VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254.....	65
FIGURA 19	DESENVOLVIMENTO DOS FRAGMENTOS MICELIAIS DE <i>P. citricarpa</i> RETIRADOS DO TESTE DE FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS	66
FIGURA 20	EFEITO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO LGMF1254 SOBRE FRUTOS ORIUNDOS DE REGIÕES COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>P. citricarpa</i> PELOS COMPOSTOS VOLÁTEIS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA (%).....	58
GRÁFICO 2 DIÂMETRO MÉDIO DE CRESCIMENTO DO ISOLADO LGMF1254 MEDIANTE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CITROS SOBRE O PATÓGENO <i>Phyllosticta citricarpa</i> MEDIANTE CULTURA PAREADA.....	41
TABELA 2	INIBIÇÃO DE <i>P. citricarpa</i> POR METABÓLITOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	50
TABELA 3	CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>P. citricarpa</i> MEDIANTE TESTE DOS METABÓLITOS DIFUSÍVEIS NO MEIO DE CULTURA.....	52
TABELA 4	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE <i>P. citricarpa</i> PELO ISOLADO LGMF1254 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	58
TABELA 5	VOLUME DISPONÍVEL NO INTERIOR DOS POTES UTILIZADOS PARA O TESTE EM FRUTOS ORIUNDOS DE REGIÃO COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA	63
TABELA 6	RELAÇÃO VOLUME DISPONÍVEL E TAMANHO DA LESÃO	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	MANCHA PRETA DOS CITROS	16
3.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS	22
3.3	CONTROLE BIOLÓGICO E POTENCIAL DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	TESTES DE ANTAGONISMO À <i>Phyllosticta citricarpa</i>	29
4.1.1	Cultura Pareada (Mariano,1993)	29
4.1.2	Teste Dos Metabólitos Voláteis	30
4.1.3	Teste Dos Metabólitos Não Voláteis	31
4.2	INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DO COMPOSTO VOLÁTIL.....	32
4.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA.....	32
4.4	IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE REGIÃO ITS DO DNA RIBOSSOMAL	33
4.4.1	Reação De Sequenciamento	34
4.4.2	Edição E Análise Das Sequências.....	34
4.5	EFEITO DOS VOLÁTEIS NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INDUZIDAS EM FRUTOS	35
4.6	ANÁLISE DO VOLÁTIL NA FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS.....	36

4.7	ANÁLISE DA VIABILIDADE DO INÓCULO UTILIZADO NO TESTE DE PICNÍDIOS APÓS O TRATAMENTO	37
4.8	ANÁLISE DOS VOLÁTEIS NA FORMAÇÃO DE LESÕES EM FRUTOS PROPENSOS À DOENÇA	38
5	RESULTADOS	39
5.1	CULTURA PAREADA.....	39
5.2	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	43
5.3	TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS	49
5.4	INIBIÇÃO POR METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS.....	51
5.5	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO ITS	52
5.6	INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DO COMPOSTO VOLÁTIL DO ISOLADO LGMF1254.....	57
5.7	INIBIÇÃO INIBIÇÃO DE LESÕES INDUZIDAS EM FRUTOS MEDIANTE EXPOSIÇÃO A COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254.....	61
5.8	TESTE DE FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHAS.....	63
5.9	TESTE DA VIABILIDADE DOS FRAGMENTOS DE MICÉLIO DE <i>P. citricarpa</i> APÓS O TESTE DE PICNÍDIOS.....	65
5.10	EFEITO DOS VOLÁTEIS NA INIBIÇÃO DE SINTOMAS EM FRUTOS DE REGIÕES COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA	66
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	71
8	REFERÊNCIAS	72
9	ARTIGO: Fungo endofítico de citros com potencial para o controle da Mancha Preta Dos Citros	80
	APÊNDICE	99

1 INTRODUÇÃO

A Mancha Preta dos Citros (MPC) ou pinta preta dos citros é uma patologia vegetal de difícil controle provocada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa. Apesar de não deteriorar o conteúdo interno, o patógeno danifica a casca do fruto, o que o acarreta recusa para o comércio *in natura* e em casos mais severos promove a queda prematura dos frutos, reduzindo a produtividade. Em vista das restrições fitossanitárias impostas pelos países importadores, cargas do fruto infectado são rejeitadas, originando prejuízo aos países produtores.

O controle da MPC no campo é feito principalmente através de sucessivas aplicações de agroquímicos, que geralmente são os mesmos utilizados no controle de outras doenças fúngicas de citros. Apesar dos fungicidas garantirem uma estabilidade na produção, seu uso contínuo e prolongado pode levar à seleção de linhagens resistentes, tornando ineficientes as medidas de controle disponíveis. Diante disso, e tendo a sociedade maior consciência dos danos que os agroquímicos causam à saúde humana e ao ambiente, é crescente o número de pesquisas relacionadas ao uso de agentes naturais no controle de doenças em plantas.

Microrganismos endofíticos são considerados aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida. A natureza da interação pode variar conforme as espécies relacionadas, podendo ser o microrganismo um patógeno oportunista ou até mesmo ocorrer simbiose. Podem exercer ação mutualística com o hospedeiro: enquanto a planta fornece um lugar seguro e com reservas nutricionais, o microrganismo inibe a infecção por patógenos, seja por competição, parasitismo ou produção de substâncias antagônicas ao agente causal de doenças.

Nesse contexto, o uso de microrganismos endofíticos isolados de citros com ação antagônica a *Phyllosticta citricarpa* possui oportuno potencial no biocontrole da MPC. Devido aos problemas ambientais e de saúde, muitos fungicidas utilizados na agricultura vem sendo removidos do mercado, o que gera uma necessidade da substituição alternativa deste agroquímico para o controle de pragas e patógenos. Entretanto, um conhecimento mais apurado em relação às interações entre os

microrganismos necessita antes ser compreendido para que tais benefícios sejam explorados.

2 OBJETIVOS

- Selecionar fungos endofíticos isolados de citros com possível ação antagônica à *Phyllosticta citricarpa*;
- Identificar os fungos com atividade antagônica através da caracterização macro e microscópica e pelo sequenciamento parcial da região ITS do rDNA;
- Estabelecer possibilidades para o controle biológico do fungo fitopatogênico *Phyllosticta citricarpa*, causador da Mancha Preta dos Citros.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MANCHA PRETA DOS CITROS

A Mancha Preta dos Citros (MPC), também conhecida como pinta preta, é uma fitopatologia ocasionada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa (1973), teleomorfo *Guignardia citricarpa* Kiely (1948). Este microrganismo provoca lesões em frutos cítricos afetando todas as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*), limões verdadeiros (*Citrus limon* e *Citrus limonia*), pomelos (*Citrus maxima*) e algumas variedades de tangerina (*Citrus reticulata*), excluindo-se apenas variedades de laranja azeda (*Citrus aurantium*) e lima ácida “Tahiti” (*Citrus latifolia* Tanaka), (KOTZÉ, 1981; BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008). As perdas provocadas pela doença podem ser muito elevadas, principalmente em limões verdadeiros, mexericas “Rio” e “Montenegrina”, laranjas doces, tangores “Murgot” e algumas tangerinas (FEICHTENBERGER, 1996; KIMATI; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2005).

Os sintomas da doença são aparentes em folhas, pecíolos, ramos, espinhos, pedúnculos e principalmente frutos, que ficam impróprios para exportação e são também muito depreciados no mercado nacional de fruta fresca (KIMATI, BERGAMIN FILHO, AMORIM 2005).

Este fungo deteriora a casca do fruto, que desenvolve lesões com centro deprimido de cor marrom-escuro ou cinza clara, bordos salientes escuros com halo amarelo-esverdeado. A intensidade da doença além de prejudicar a aparência, está diretamente relacionada à queda prematura dos frutos, reduzindo a produtividade e a qualidade, e assim, inviabilizando a comercialização (SPOSITO, 2003; GASPAROTTO; PEREIRA, 2004).

A temperatura e a luz influenciam o desenvolvimento de *P. citricarpa* em frutos, em invernos rigorosos e épocas de seca a incidência é menor e na extremidade do fruto voltada para o sol a incidência de lesões é mais evidente (KOTZÉ, 1981).

Os sintomas geralmente surgem tarde e durante a temporada os frutos que não apresentam indícios da doença podem vir a desenvolver os sintomas no período pós-colheita. O surgimento das lesões é muito influenciado pelas condições de

transporte ou armazenamento, temperaturas elevadas e alta luminosidade durante este período favorecem o desenvolvimento dos sintomas (AGOSTINI; PERES *et al.* 2006).

A MPC tem sido encontrada em diversas regiões produtoras de citros no mundo, como Argentina, Hong-Kong, China, Indonésia, Japão, Quênia, Nigéria, Suazilândia, Moçambique, Filipinas, Peru, Taiwan, Uruguai, Venezuela, Zimbábue, varias regiões da África do Sul, na costa da Austrália e Brasil (TIMMER, GARNSEY; GRAHAM 2002). Mais recentemente foram encontrados pomares cítricos infectados em Uganda (REEDER, KELLY; HARLING, 2009) e em Gana (BRENTU *et al.*, 2012), sendo este país localizado na costa oeste do continente africano, demonstrando a dispersão da doença.

Os primeiros relatos da doença são datados de 1895 em frutos de uma região citrícola nos arredores de Sidnei, Austrália, acarretando perdas na produção e no pós-colheita (ROBBS, 1990). O primeiro registro da doença no Brasil é datado entre 1938 e 1940, em uma feira no estado de São Paulo, não recebendo, entretanto, importância na época (AVERNA-SACCÁ, 1940). A MPC já foi relatada em regiões citrícolas de vários estados como Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Amazonas e Paraná (KIMATI, 2005; NUNES *et al.*, 2006).

A doença é considerada quarentenária A1 na União Europeia por não estar presente em seus países membros. Em virtude disso, a tolerância em relação à importação de frutos que apresentem sintomas da doença é zero e cargas inteiras são recusadas.

Em abril de 2010, a preocupação de citricultores do estado da Flórida, nos Estados Unidos da América, aumentou com a chegada da MPC em seus pomares, pois sua ocorrência foi reconhecida pelo governo estadunidense. Alguns pesquisadores já verificaram que frutas da região estão infectadas e expressam preocupação com a falta de medidas eficientes para o controle da doença (LEMON; MCNALLY, 2010).

Os frutos acometidos pela MPC apresentam diferentes formas de lesões. Abaixo a descrição realizada por Kotzé (1981) e na Figura 1 a identificação destas lesões.

Mancha dura (Mancha Preta): São os sintomas típicos e mais comumente encontrados nos frutos, geralmente durante o início da maturação. Em frutos verdes,

um halo amarelo circunda cada lesão; em frutos maduros, um halo verde circula uma lesão marrom, que apresenta centro em depressão com coloração variando de marrom claro a acinzentado. As bordas da lesão são de coloração marrom escuro e salientes. Os pontos pretos são formados no cerne. Embora haja a presença de picnídios, ascósporos não são evidenciados. Frutos colhidos e infectados, apesar de não apresentarem sintomas aparentes, podem desenvolvê-los durante o transporte ou armazenagem. Foi evidenciado que as manchas desta categoria ocorrem com maior frequência no lado voltado à luz solar.

Kotzé descreveu também sintomas semelhantes aos da melanose dos citros, não estando envolvido, entretanto a presença de *Diaporthe citri* Wolf, sendo os sintomas decorrentes da infecção por *P. citricarpa* e recebendo a denominação de falsa melanose. As lesões são muito pequenas e numerosas, de coloração escura que em geral aparecem em frutos jovens. No decorrer da temporada a falsa melanose pode vir a desenvolver lesões do tipo mancha dura.

Mancha sardenta: São lesões pequenas de coloração pardo-avermelhadas, levemente deprimidas, com bordos definidos e formato irregular, normalmente sem apresentar as frutificações do fungo. Ocorrem após o início da maturação dos frutos, sendo quase invisíveis a olho nu e podendo coalescer originando lesões parecidas com as formadas pela melanose. Em condições favoráveis de temperatura e luminosidade podem dar origem à mancha virulenta. A ocorrência é maior em frutos armazenados em temperaturas acima de 20°C.

Mancha virulenta: Pode ser resultante da evolução das manchas pretas e aparecem geralmente ao final da safra, quando os frutos estão maduros. Sintomas são mais evidenciados com ocorrência de altas temperaturas. Caracteriza-se pela formação de lesões grandes, escuras ou de coloração marrom escuro, deprimidas, com ou sem frutificações, de formato irregular. O centro possui cor cinza e as bordas são salientes, marrom escura ou vermelha escura, com ou sem frutificações.

São considerados também mais dois tipos de expressão dos sintomas, a mancha rendilhada e mancha trincada (GOES, 2005):

Mancha rendilhada: São lesões superficiais sem bordas definidas e textura lisa, coloração alaranjada com o centro amarelo-marrom a marrom-escuro que aparecem quando os frutos ainda estão verdes. Estas lesões podem atingir grande parte da superfície do fruto.

Mancha trincada: A lesão é superficial e ocorre em pequeno número nos frutos ainda verdes. Após a maturação, a lesão trinca e é associada ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*).

Não foram relacionados os diferentes tipos de sintomas com a infecção acarretada por diferentes propágulos, devido ao estágio de maturação do fruto, fatores ambientais ou da combinação desses fatores (AGOSTINI *et al.*, 2006).

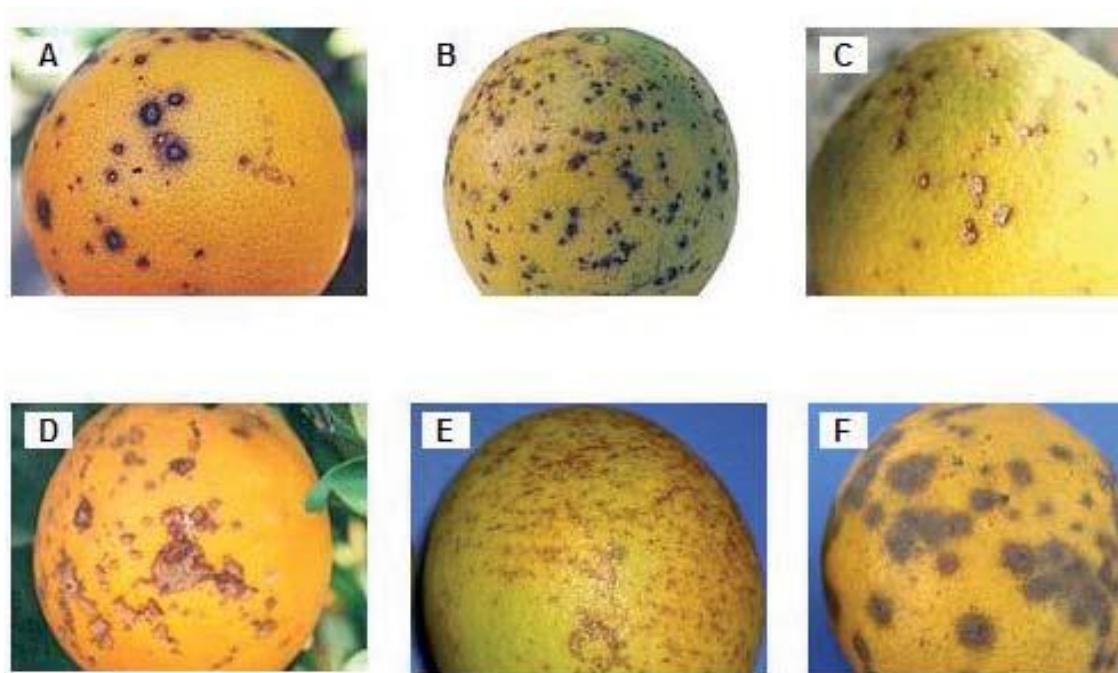


Figura 1 - SINTOMAS DA MANCHA PRETA EM FRUTOS: (A) MANCHA PRETA, (B) FALSA MELANOSE, (C) MANCHA SARDENTA, (D) MANCHA VIRULENTA, (E) MANCHA RENDILHADA E (F) MANCHA TRINCADA.

Fonte: SILVA-PINHATI *et al.*, 2009

A disseminação da MPC pode ocorrer através de picnidiósporos, fase assexual, ou dos ascósporos, correspondentes a fase sexuada. Os picnídios geralmente formam-se em lesões nos frutos infectados, galhos e folhas caídas e, ocasionalmente, em pedúnculos e nas folhas infectadas. No interior dos picnídios são formados os picnidiósporos, que estão relacionados com as infecções a curta distância, pois são levados pela água das chuvas, orvalho ou irrigação, contaminando outros frutos em desenvolvimento (KOTZÉ, 1981; AGOSTINI *et al.*, 2006).

Os ascósporos são formados nas folhas caídas e são dispersos pelo ar, atingindo a superfície de frutos e folhas, disseminando a doença. É a principal fonte de inóculo quando um estágio de epidemia se estabelece nos pomares.

O contato de picnidiósporos ou ascósporos na superfície úmida do fruto possibilitam o desenvolvimento de um apressório, que forma uma hifa infectiva e penetra na cutícula do vegetal. Posteriormente, uma massa micelial desenvolve-se no interior dos tecidos da casca. Uma característica importante do MPC é o fato da infecção apresentar um longo período de latência após o contágio (ROBBS, 1990; KOTZÉ, 1981). O controle da doença baseia-se na aplicação de fungicidas protetores, sistêmicos ou a mistura deles, associados a óleos minerais ou vegetais, sendo o grupo dos benzimidazóis (benomil, carbendazim, tiofanato metílico e tiabendazol) o mais frequentemente utilizado nos pomares cítricos do Brasil (GOES, 2002).

O controle químico usualmente aplicado no campo é uma prática importante, reduzindo de maneira eficaz os danos quantitativos causados pela queda prematura de frutos sintomáticos. Entretanto, não é capaz de reduzir a intensidade da doença para a produção de frutos *in natura* nas áreas com alta incidência (SPOSITO, 2003).

Segundo Feichtenberger (1996), uma das medidas de controle seriam as pulverizações visando a proteção dos frutos durante o principal período de suscetibilidade, de até 4 a 5 meses após a queda das pétalas, com fungicidas sistêmicos (benzimidazóis ou estrobilurinas) ou de contato (cúpricos ou ditiocarbamatos), preferencialmente de forma associada, acrescidos de óleo mineral ou vegetal. Cobre é usado como protetor para muitos desses problemas, devendo ser utilizado com cautela, pois existe o risco de toxicidade (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Uma vez que desde a infecção até o aparecimento dos sintomas existe um longo período quiescente, Kotzé (1981) sugere que o sucesso no controle da doença através de fungicidas sistêmicos depende em explorar esse período.

Como medidas preventivas recomenda-se a retirada dos frutos temporões infectados, recobrir as folhas infectadas caídas, evitar o trânsito de frutos e a utilização de materiais de colheita de outras propriedades localizadas em regiões afetadas (SANTOS-FILHO *et al.*, 2005).

As doenças fúngicas geralmente são difíceis de controlar com os defensivos disponíveis (DAVIES; ALBRIGO 1994). São poucos os fungicidas eficazes contra a

MPC, e são na maioria das vezes usados também no manejo de outras doenças fúngicas na citricultura, tais como a podridão-floral (*Colletotrichum acutatum* Simmonds), verrugose (*Elsinoe spp.*) e melanose (*Diaporthe citri* Wolf) (RODRIGUEZ *et al.*, 2007). Desta forma, o emprego contínuo de fungicidas promove a seleção de linhagens resistentes do agente causal. Este fato foi comprovado nas principais regiões citrícolas da África do Sul e acarretou importantes perdas econômicas para este país (HERBERT, 1985; SCHUTTE, 2003). A resistência de *P. citricarpa* a benzimidazóis já foi descrita em regiões citrícolas no estado de São Paulo, onde havia frequente aplicação deste fungicida (RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

Possiede *et al.* (2009) investigaram os efeitos *in vitro* dos fungicidas benomil e azoxistrobin em 10 linhagens de *P. citricarpa* isoladas de lesões em plantas cítricas no Brasil e na África do Sul. Todas as linhagens isoladas de pomares brasileiros apresentaram suscetibilidade ao Benomil na concentração 0,5 µg/mL. O Azoxystrobin não inibiu o desenvolvimento das linhagens até na concentração de 10 µg/mL, entretanto, exerceu considerável redução na taxa de esporulação. As linhagens de origem sul-africana apresentaram resistência ao Benomil em concentração de até 100 µg/mL do fungicida, e diferente das linhagens do Brasil, não tiveram redução na taxa de esporulação quando submetidas ao tratamento com Azoxystrobin. A análise por RAPD demonstrou que a sensibilidade das linhagens de *P. citricarpa* à estrobilurina possivelmente estaria relacionada à variabilidade genética dos isolados, uma vez que linhagens mais próximas apresentaram diferentes respostas ao fungicida, e entre linhagens com maior variação foi observada suscetibilidade similar.

Muitos mecanismos de resistência ainda são desconhecidos. Alguns incluem a alteração bioquímica do sítio alvo, de modo que este apresenta perda de sua suscetibilidade. Pode também ocorrer o desenvolvimento de uma via metabólica alternativa, que evita o sítio alvo. Alguns organismos tornam-se aptos a degradação metabólica do fungicida; e ainda a exclusão ou expulsão do mesmo. Assim, populações de patógenos que desenvolvem resistência a um determinado fungicida, simultaneamente tornam-se resistentes a outros que possuam o mesmo mecanismo de ação (BRENT; HOLLOMON, 2007).

Problemas como o surgimento de isolados de *Phyllosticta citricarpa* resistentes aos agroquímicos, impactos negativos ao ambiente e restrições de ordem pública e econômica estimulam a busca de novas alternativas de controle de

doenças, principalmente pela introdução de agentes de biocontrole e de produtos alternativos (BERNARDO; BETIOL, 2010).

3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

O termo endofítico foi proposto por Bary em 1866, conforme cita Suryanarayanan *et al.* (2009) e compreendia toda comunidade microbiana residente no interior dos tecidos vegetais saudáveis. Carroll (1988) revisou esta definição e propôs que endofíticos abrangia qualquer microrganismo que em pelo menos uma fase do ciclo de vida, habitavam o interior de tecidos vegetais aéreos sem danos aparentes a planta. Uma definição mais atual e específica de endófitos considera todos os microrganismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior de tecidos vegetais de forma assintomática, sem a formação de estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2006). Esta última definição desconsidera os fungos micorrízicos e bactérias nodulantes, e inclui os microrganismos de difícil manipulação em laboratório, mas passíveis de identificação mediante técnicas de DNA *fingerprinting* ou metagenômica.

Na endosfera vegetal, que compreende os tecidos intersticiais da planta, os endofíticos estão em ambiente protegido, que lhes confere vantagem competitiva sobre microrganismos da filosfera ou da rizosfera, com fluxo contínuo de nutrientes, pH e umidade adequados, assim como proteção de um alto número e densidade de competidores (BACKMAN; SIKORA, 2008).

A comunidade endofítica pode eventualmente fornecer algum benefício para o hospedeiro, tal como proteção contra patógenos e pragas, produção de hormônios vegetais e aumentar a resistência ao estresse hídrico. A presença destes microrganismos atua controlando a incidência de patógenos, seja por parasitismo, competindo por espaço e nutrientes ou produzindo substâncias antagônicas e assim reduzindo o aparecimento de doenças (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; AZEVEDO, 2008; MACCHERONI; ARAÚJO; LIMA, 2010). Segundo Backman e Sikora (2008) os organismos endofíticos são de alguma maneira, selecionados para seu nicho devido aos efeitos benéficos que oferecem ao hospedeiro e devido à habilidade em resistir aos mecanismos de defesa da planta. A energia despendida

pelo hospedeiro na produção e manutenção da biomassa endofítica é provavelmente compensada pela melhora na saúde da planta devido à presença dos microrganismos.

Sieber (2007) analisando árvores das famílias Betulaceae, Fagaceae, Cupressaceae e Pinaceae quanto à presença de endofíticos, relatou a frequente dominância dos mesmos endofíticos nas espécies mais relacionadas. A relação de dominância endofítica decresce conforme o parentesco entre as espécies hospedeiras diminui, sendo estas mais pronunciadas entre as angiospermas e gimnospermas: as angiospermas apresentaram dominância representada pela ordem Diaporthales ao passo que nas gimnospermas a presença da ordem Helotiales foi mais frequente. O autor coloca que a divergência entre angiospermas e gimnospermas ocorreu a aproximadamente 300 milhões de anos, e estima-se que no mesmo período tenha ocorrido a divergência entre os ascomicetos Diaporthales e Helotiales. De acordo com esta hipótese, as interações entre plantas e endófitos seriam de longa data e uma co-evolução teria moldado a simbiose encontrada atualmente (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990). Corroborando com isso está a ausência ou a branda patogenicidade (quando existente) da comunidade endofítica em comparação com microrganismos epifíticos.

Em virtude da longa convivência entre planta e endofítico, é provável que possa ter ocorrido transferência de ácidos nucleicos entre estes, uma vez que moléculas orgânicas relativamente raras produzidas por plantas são, em alguns casos, também produzidas por certos tipos de endofíticos, utilizando uma via metabólica semelhante para a síntese destes compostos (STROBEL, 2002; WANG; DAI, 2010).

Embora a natureza assintomática dos endofíticos aparente relações simbióticas ou mutualísticas com a planta, a diversidade de espécies sugere que eles podem também ser saprófitos agressivos ou patógenos oportunistas, deixando o estado quiescente quando as condições são favoráveis e/ou quando estas são desfavoráveis para o hospedeiro. É provável que alguns endofíticos tornem-se saprófitos durante a senescência da planta, dando início à degradação biológica (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003; HYDE; SOYTONG, 2008). Uma vez que a vasta maioria das plantas ainda não foi estudada quanto à presença e diversidade de seus endofíticos, existe uma enorme oportunidade para o isolamento de novas formas fúngicas, táxons e biótipos (STROBEL, 2003).

Os fungos são os microrganismos endofíticos predominantes. O número de espécies detectadas depende de fatores bióticos, abióticos e experimentais, da espécie hospedeira, tipo e fase do órgão vegetal, condições edáficas e climáticas, do procedimento do isolamento e número e tamanho da amostra (SIEBER, 2007).

Os endófitos podem ser transmitidos de uma geração para outra através das sementes ou de propágulos vegetativos, entretanto, a maior parte dos microrganismos é transmitida horizontalmente através de esporos (CARROLL, 1988). A penetração no hospedeiro é realizada principalmente pelos estômatos, raízes e eventuais ferimentos (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Atualmente os endofíticos são considerados uma excelente fonte de produtos bioativos naturais, devido ao fato de muitos serem encontrados ocupando milhares de nichos ecológicos amplamente encontrados em plantas vasculares em ambientes diversos, sendo relatados também em algas, musgos, samambaias (TAN; ZOU, 2001; STROBEL, 2003) e líquens (LI *et al.*, 2007).

3.3 CONTROLE BIOLÓGICO E POTENCIAL DOS MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Em termos gerais, controle biológico é a supressão de danos causados por um organismo, devido à atividade de outros organismos, geralmente considerados inimigos naturais. Inclui ainda a utilização de produtos extraídos de origens naturais ou fermentados para o controle do organismo causador de danos. Em fitopatologia, o termo é aplicado ao uso de microrganismos antagonistas na supressão de doenças e abrange também o uso de patógenos hospedeiro-específicos no controle de ervas daninhas (PAL; MCSPADDEN, 2006).

O interesse científico no controle biológico de fitopatógenos tem sido estimulado pela crescente ciência dos efeitos nocivos que alguns defensivos oferecem à saúde humana e ao ambiente. Há também uma necessidade de controlar várias doenças para as quais atualmente não existe tratamento eficiente, onde a rotação de cultura é impraticável ou em situações que o controle químico é inviável (STROBEL; DAISY, 2003; TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2004).

Devido aos problemas de saúde e ambientais, muitos agentes sintéticos utilizados na agricultura foram e têm sido removidos do mercado, o que gera a necessidade de encontrar formas alternativas para o controle de pragas e patógenos (STROBEL, 2003). Caso recente foi evidenciado na utilização do fungicida Carbendazim, permitido no Brasil, Japão, Canadá e União Europeia, mas restringido nos Estados Unidos, os maiores importadores da produção brasileira. Segundo a *Food and Drug Administration*, o fungicida pode deixar resíduo acima do nível tolerável nos derivados cítricos, apesar disso, o uso nos EUA é autorizado na produção de maçãs (ASSOCITRUS, 2012).

Segundo Hawksworth (2004) estima-se que exista 1,5 milhões de espécies fúngicas e destas 100.000 foram descritas, o que significa que se conhece apenas cerca de 7 % das espécies de fungos do planeta. O restante estaria em florestas tropicais, em ambientes inexplorados e parte seriam espécies isoladas, porém não identificadas e nomeadas.

Das espécies conhecidas, poucas foram testadas quanto à produção de metabólitos bioativos, o que revela o potencial econômico inexplorado dos fungos (SURYANARAYANAN *et al.*, 2009). Das cerca de 300.000 espécies de plantas existentes no planeta, cada uma é hospedeira de um ou mais endofíticos. Embora apenas uma pequena parcela destas já tenha sido estudada quanto à sua comunidade endofítica, investigações deste cunho são cada vez mais frequentes na literatura (STROBEL, 2003; HYDE; SOYTONG, 2008). Este crescente número é uma premissa para o aumento do conhecimento da biodiversidade e para a descoberta de novos compostos e estruturas bioativas (GUO *et al.*, 2008).

Produtos resultantes do metabolismo secundário de endofíticos são intensamente estudados por apresentarem oportuna utilização na indústria, medicina e agricultura, e incluem alcalóides, benzopirranonas, flavonóides, ácidos fenólicos, quinonas, esteróides, terpenóides, tetralonas e xantonas (TAN; ZOU, 2001). Algumas das diversas utilizações das substâncias produzidas por endofíticos são utilizadas como compostos anticancerígenos, antioxidantes e antimicrobianos (PIMENTEL *et al.*, 2011). A maioria dos microrganismos produz e secreta um ou mais compostos com atividade antibiótica, em alguns casos eficazes na supressão de fitopatógenos e doenças causadas por estes (PAL; MCSPADDEN, 2006).

Lu *et al.* (2000) identificaram os compostos produzidos por *Colletotrichum* sp isolado da planta medicinal *Artemisia annua*. Três novos compostos encontrados

apresentaram atividade contra fungos e bactérias patogênicas ao homem, além de atividade fungistática a fitopatógenos. O fungo produziu outras substâncias, dentre elas ergosterol e Ácido indolacético. Segundo os autores, a produção de metabólitos tóxicos ou letais aos fitopatógenos e a presença dos reguladores vegetais, denota que *Colletotrichum* sp esteja presumivelmente envolvido no sucesso de adaptação e competição da planta no ambiente.

Os mecanismos de defesa das plantas contra fungos patogênicos incluem o acúmulo de metabólitos antifúngicos em resposta ao ataque dos fitopatógenos e a presença constitutiva destes compostos. A degradação dessas substâncias ou conversão para produtos menos tóxicos é um importante método utilizado por patógenos para ultrapassar a defesa do hospedeiro (VANETTEN *et al.*, 1989).

Alguns compostos bastante caracterizados por esta atividade são os ácidos Hidroxâmicos (NIEMEYER, 2009). Quando desencadeada a resposta de defesa (lise celular), os ácidos hidroxâmicos são convertidos para compostos tóxicos como BOA (benzoxazolinon 2-benzoxazolinona) e HBOA (2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-1) nocivos a microrganismos e nematóides (SAUNDERS, 2009). A presença dos endofíticos convivendo com compostos tóxicos indicam um potencial adaptativo de biodegradação e a produção de um conjunto de enzimas específicas que permitem a sua sobrevivência sob tais condições. Zikmundova *et al.* (2002) em experimento *in vitro*, relatou a conversão mediada pelo endofítico *Fusarium sambucinum*, de Ácidos Hidroxâmicos BOA e HBOA para N-(2-hydroxyphenyl) ácido malonâmico, um composto de baixa toxicidade. Algumas espécies de *Fusarium* patogênicos são bastante tolerantes ao BOA, fato que garante o sucesso da colonização no hospedeiro. Além disso, a susceptibilidade da maioria dos microrganismos limita a competição com o patógeno (SAUNDERS, 2009).

Fungos endofíticos isolados de plantas medicinais oferecem uma oportuna fonte de novos metabólitos secundários. Gomes-Figueiredo *et al.* (2007) analisaram a atividade de *Pestalotiopsis* sp, isolados da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss, (Espinheira Santa) nativa da América do Sul e popularmente utilizada no tratamento de úlceras estomacais e problemas gástricos. Os metabólitos produzidos por alguns destes isolados demonstraram inibição a patógenos humanos, como *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina.

Devido às suas propriedades farmacológicas, a planta *Annona squamosa* é utilizada pela medicina popular em diversas regiões da Índia. É utilizada como preventivo ao diabetes e redução do hipertireoidismo, sendo também reportadas propriedades anticancerígenas, abortivas e inseticidas. Lin *et al.* (2010) exploraram a comunidade endofítica desta planta, encontrando 19 gêneros, sendo a maioria pertencente às ordens Diapothales e Hypocreales. Alguns destes endófitos demonstraram ampla atividade antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, atividade inibitória da acetilcolinesterase e da tripsina. A ordem Diapothales apresentou alta frequência de domínios gênicos para a enzima policetídeo sintase, (PKS), que são relacionados à síntese de produtos naturais em muitos microrganismos.

Os resultados obtidos em ambientes controlados nem sempre são condizentes com os testes a campo, porém, delimitam os microrganismos que exercem alguma inibição ao patógeno. Kupper *et al.* (2011) testou em campo a atividade inibitória aos sintomas da MPC, utilizando linhagens de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma spp.* Embora os resultados em laboratório tenham sido promissores, com *Trichoderma viride* (ACB14) e *Trichoderma sp* (ABC40) inibindo o desenvolvimento de *P. citricarpa* em 50% e 56,8% respectivamente, em campo os resultados utilizando caldo fermentado não demonstraram exercer um controle eficiente. As linhagens de *Bacillus subtilis* em campo demonstraram ser potenciais para o controle biológico, entretanto, os resultados foram variáveis e dependentes das condições ambientais.

O estudo de antagonismos por compostos orgânicos voláteis (COV) não é tão frequente na literatura quando comparado aos testes de metabólitos difusíveis (CHAURASIA *et al.*, 2005). Entretanto, a comunidade científica tem cada vez mais atentado à importância da pesquisa de COV. Grandes quantidades são formadas como produtos finais do metabolismo da fermentação anaeróbica. Podem ser formados também durante a degradação de moléculas orgânicas complexas, que são perdidos antes da completa degradação e absorção pelo microrganismo (INSAM; SEEWALD, 2010).

O fungo endofítico *Musdocor albus* é frequentemente citado na literatura como o mais promissor produtor de COV. Este xilareáceo não esporulante, foi isolado de folhas de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e foi letal para certos fungos e bactérias pela produção de uma mistura de compostos voláteis. A análise dos

COV através de cromatografia gasosa identificou que este endofítico produz 25 compostos voláteis diferentes (STROBEL *et al.* 2001; STROBEL, 2003).

Ezra *et al.* (2004), identificaram e mimetizaram artificialmente os COV produzidos pelo endofítico *Musdocor albus*. Os compostos encontrados resultaram na inibição e em alguns casos, na letalidade de diversos microrganismos, incluindo leveduras, bactérias e fitopatógenos. Além desta espécie, outros membros deste gênero, como *M. crispans* e *M. roseus* produzem COV que demonstraram eficiência na micofumigação de vários fitopatógenos de várias classes fúngicas como *Verticillium dahliae*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Aphanomyces cochlioides* (STINSON *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2010).

Compostos voláteis são potenciais no tratamento de sementes, flores e frutos e outras partes das plantas quando armazenadas ou enquanto são transportadas, reduzindo ou eliminando lesões e doenças provocadas por microrganismos (WORAPONG, 2001; MERCIER; JIMENEZ, 2004). Fialho *et al.*, (2010) analisou a atividade dos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *P. citricarpa*. Os constituintes voláteis inibiram em até 87,2% o desenvolvimento micelial do patógeno. Utilizando cromatografia gasosa acoplada a microextração em fase sólida (SPME-CG-MS), foram identificados 7 constituintes produzidos, sendo etil acetato, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, álcool feniletil, etil octanoato e predominância de etanol. Em virtude do baixo espectro de fungicidas permitidos no pós-colheita, os autores sugerem que o tratamento com os voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* ou mimetizados, podem proteger os frutos durante o transporte ou armazenamento em câmaras fechadas. A ação protetora dos metabólitos endofíticos juntamente com agentes químicos comerciais, poderá futuramente levar a um efeito sinérgico contra doenças em plantas (BACKMAN; SIKORA, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O Projeto foi conduzido utilizando fungos endofíticos pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR (LabGeM). Os microrganismos são oriundos de folhas de pomares cítricos da região norte do

Paraná, *a priori* ausentes da presença do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, coletadas em maio e junho de 2010. O isolamento foi conduzido mediante diferentes condições de pH e temperatura: pH 5,8 e 6,8 e temperaturas de 22°, 28° e 35° *Celsius*, visando obter uma maior abrangência dos possíveis endófitos. Todos os isolados foram mantidos em mesma condição, plaqueados em meio BDA pH 6,8 e a temperatura ambiente (SCHUH, 2010 com. pes.). Os fungos que apresentaram semelhança morfológica foram agrupados e foi escolhido um representante para o grupo. Foram obtidos 68 grupos que apresentaram morfologias distintas, que compuseram os isolados para o experimento.

Para os testes de antagonismo foi utilizado o fungo *Phyllosticta citricarpa* linhagem LGMF06 (33/05) LabGeM – UFPR, cultivado em meio BDA pH 5,8.

A coleção foi mantida em tubos de ensaio em meio BDA pH 6,8 e repiques foram realizados a cada três meses. Foram também armazenados em água destilada conforme o método de Castellani (1939).

4.1 TESTES DE ANTAGONISMO À *Phyllosticta citricarpa*

A atividade antagônica dos 68 isolados foi testada contra o fitopatógeno *P. citricarpa* mediante confronto direto em placa, pela inibição de crescimento devido à produção de metabólitos voláteis e pela produção de metabólitos não voláteis, conforme descrito a seguir:

4.1.1 Cultura Pareada (Mariano,1993)

Os isolados foram transferidos para placas de Petri com meio BDA pH 6,8 a 28°C. Após sete dias, cilindros de micélio com 6 mm de diâmetro foram retirados e depositados em mesma placa com cilindros de micélio de *P. citricarpa*. O patógeno foi inoculado na placa três dias antes dos endofíticos. Os cilindros foram depositados sobre meio completo pH 6,8, a uma distância de 2 cm da borda da placa em linha

mediana. As placas foram vedadas com filme plástico PVC e mantidas em BOD a 28°C. O ensaio foi realizado com quatro repetições.

No grupo controle, apenas cilindros de micélio do fitopatógeno foram depositados sobre a placa, dispostos da mesma forma que os tratamentos. Os diâmetros das colônias foram aferidos após 7 e 14 dias de crescimento. Como controle negativo utilizou-se o fungicida Carbendazim (Derosal 500) na concentração de 1 mg/mL no meio de cultura (RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

A porcentagem de inibição do crescimento de *P. citricarpa* foi realizada conforme Edginton *et al.* (1971), estimado pela diferença entre a média de crescimento do fitopatógeno e a média do crescimento do endofítico, dividido pela média do fitopatógeno. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de LSD (*least significant difference*) a 5% de probabilidade.

4.1.2 Teste Dos Metabólitos Voláteis

Para testar a inibição de *P. citricarpa* devido à produção de metabólitos voláteis pelos isolados endofíticos, foi realizado confronto em placas de Petri com divisória. Após sete dias de crescimento, de cada isolado foi retirado um cilindro de micélio de 6 mm de diâmetro, que foi depositado na extremidade oposta ao fitopatógeno, este já com 3 dias de vantagem.

Utilizou-se meio completo (AZEVEDO; COSTA, 1973) em pH 6,8. Como controle, um cilindro de micélio do fitopatógeno foi inoculado na extremidade oposta da placa. As placas foram vedadas com filme plástico PVC e mantidas em BOD a 28° C. O experimento foi realizado com 4 repetições.

As leituras foram realizadas mensurando o diâmetro das colônias do fitopatógeno com 7 e 14 dias de crescimento. Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação LSD a 5%.

4.1.3 Teste Dos Metabólitos Não Voláteis

Os isolados que apresentaram inibição superior a 50% no diâmetro de *P. citricarpa* nos testes anteriores foram selecionados para a análise dos metabólitos não voláteis (MARTINS-CORDER; MELO, 1998 adaptado por GOMES, 2008). Verteu-se meio BDA sobre placas de Petri e sobre o meio de cultura foi depositado uma película de papel celofane previamente esterilizado. Sobre o celofane foi inoculado micélio dos fungos endofíticos com potencial para o controle do fitopatógeno. Após 5 dias o celofane foi retirado, permanecendo o metabólito no meio de cultura. Para evitar o desenvolvimento de eventuais células remanescentes, uma alíquota de 5 mL de clorofórmio foi vertido na tampa da placa de Petri e esta mantida invertida *overnight* em fluxo laminar. Após esse período um cilindro de *P. citricarpa* com 6 mm de diâmetro foi retirada de uma cultura de 7 dias e inoculada no centro das placas. Estas foram mantidas em estufa BOD a 28 graus durante 7 dias.

A análise da possível interferência no desenvolvimento micelial foi realizada comparando os tratamentos com o controle, que consistiu da inoculação de um cilindro de *P. citricarpa* em placa onde previamente foi inoculado o próprio fitopatógeno sobre o celofane. Como controle negativo utilizou-se Carbendazim (1 mg/mL) no meio de cultura. Foi realizado também o controle sobre o uso de clorofórmio no crescimento de *P. citricarpa*.

O experimento foi realizado com 6 repetições. A análise dos valores foi realizada mediante teste Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação LSD a 5%. O endofítico com maior potencial para o controle biológico de *P. citricarpa* pela produção de um composto volátil foi selecionado nestes testes iniciais para os testes descritos a seguir e depositado na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos com o código LGMF1254.

4.2 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DO COMPOSTO VOLÁTIL

Foram testados 7 meios de cultura visando identificar a influência na produção do composto volátil. Para tanto, foram utilizadas placas de Petri com divisória. Em um dos compartimentos foi vertido 10 mL de meio completo pH 6,8 e inoculado um cilindro de 6 mm de diâmetro de *P. citricarpa*. No outro compartimento verteu-se 10 mL do meio a ser testado. Foram utilizados os meios: Meio Citros (STRINGARI, 2009), Meio Ágar Batata Dextrose (RIKER; RIKER, 1936), Meio Completo (AZEVEDO; COSTA, 1973), Meio Ágar-Aveia (HOEKSTRA; APTROOT, 1988), Meio Milho, Meio Arroz (KURTZMAN; FELL, 1998) e Ágar Extrato de Malte (HIMEDIA®). Após três dias, confirmada a viabilidade do inóculo, foi depositado um cilindro de micélio com 6 mm do isolado LGMF1254. As placas foram vedadas com plástico PVC e mantidas em BOD a 28 graus.

A determinação do meio de cultura mais promissor na produção do composto volátil foi realizada mediante a porcentagem de inibição do diâmetro da colônia do fitopatógeno, aos 7, 10, 14 e 21 dias de tratamento. O experimento foi realizado com sete repetições para cada meio de cultura.

O grupo controle consistiu da inoculação do cilindro de *P. citricarpa* em meio completo, sem a presença do endofítico. A análise estatística foi realizada mediante o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação LSD a 5%.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA

A identificação dos isolados em nível de gênero foi realizada mediante montagem de lâminas para observação das estruturas microscópicas (KERN; BLEVINS, 1999), pela técnica de microcultivo. As lâminas foram coradas com lactofenol azul de algodão e posteriormente documentadas por foto microscópio através do software ImageTool v.3 (WILCOX *et al.*, 2002). As estruturas foram comparadas com a literatura (WATANABE, 2002; BARNETT; HUNTER, 1998).

4.4 IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE REGIÃO ITS DO DNA RIBOSSOMAL

A identificação em nível de espécie foi feita pelo sequenciamento parcial da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA. Para isso, a extração de DNA foi realizada utilizando-se o Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio) conforme orientação do fabricante. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), com marcador de peso molecular o DNA do fago Lambda clivado com *Hind* III (Gibco). Adicionou-se 30% do tampão GelRed® à uma alíquota de 10 µL da amostra extraída, que foi submetida à corrida. Em seguida o gel foi revelado e foto documentado em transiluminador ultravioleta. Utilizou-se também o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para quantificação e verificação da integridade do DNA. O DNA genômico teve a região ITS amplificada por PCR utilizando os pares de primers universais para fungos V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') e LS266 (5'-GCATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') (GERRITS VAN DEN ENDE; DE HOOG, 1999) os quais permitem amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal.

A concentração final utilizada para as amplificações foram: 10 ng de DNA, Taq polimerase 0,5 U, Tampão da enzima 1x, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 µM de cada primer e 0,2 mM do mix dNTP, completando o volume com água ultra pura para 12,5 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador Labnet International (Modelo: Multigene Gradient), com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72° C.

A PCR foi purificada em tubos adicionando 2 µL de Acetato de amônio (7,5M) e 30 µL de etanol absoluto, que foram centrifugados por 45 minutos a 5000 rpm a 15°C. Descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 100 µL de etanol 70% recém-preparado. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2500 rpm e 15°C, em seguida descartou-se o sobrenadante. Os tubos foram deixados abertos, em temperatura ambiente, até a evaporação do álcool. Após a purificação da reação, o DNA foi ressuspenso em 12 µL de água ultrapura. Os fragmentos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando como

marcador de peso molecular o Ladder Ludwig 100 pb. A amostra foi posteriormente quantificada e fotodocumentada em transiluminador UV.

4.4.1 Reação de Sequenciamento

O sequenciamento da região ITS1 - 5,8S - ITS2 do rDNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger; Nicklen e Coulson (1977), utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em Sequenciador Automático de DNA.

Para reação foram utilizadas 50 ng do produto de PCR purificado, 0,25 μ M de primer, 2 μ L da mistura para sequenciamento ET (kit: DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE da Amersham Biosciences®) e água ultrapura quando necessária para completar um volume final para 10 μ L. As condições foram aplicadas para os primer V9G e LS266. A amplificação foi realizada em termociclador Labnet International (Modelo: MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler), seguindo uma desnaturação inicial a 94° C por 30 segundos, 35 ciclos de 15 segundos a 50° C e 1 minuto a 60° C. Os produtos da amplificação foram purificados com Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade, e submetidos a eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE (Amersham Biosciences®).

4.4.2 Edição e Análise das Sequências

As sequências foram editadas e alinhadas através dos softwares Bioedit (HALL, 1999) e MEGA 5.0 (TAMURA *et al*, 2011) e comparadas com as disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) visando detectar homologia com sequências de nucleotídeos depositadas.

As sequências ITS dos isolados foram alinhadas com as sequências obtidas no GenBank através do programa MUSCLE. Posteriormente foi construída uma árvore para cada isolado promissor no teste de cultura pareada, conforme o método

de máxima verossimilhança, utilizando o modelo evolutivo Tamura 3-parâmetro com valores de 1000 reamostragens.

4.5 EFEITO DOS VOLÁTEIS NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES INDUZIDAS EM FRUTOS

Frutos cultivados sem o uso de fungicidas, cedidos pelo Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura) foram externamente desinfectados e a inoculação de micélio em frutos foi realizada conforme Goulin *et al.* (2011). Em cada fruto foram marcados dez círculos na linha transversal (Figura 2), em cinco destes foi introduzido com auxílio de agulha, micélio de *P. citricarpa*, e nos círculos restantes, apenas a injúria provocada pela agulha foi realizada.

Recipientes plásticos com tampa foram esterilizados mediante limpeza interna com solução de hipoclorito e álcool 70%, e posteriormente foram submetidos à luz ultravioleta por 30 minutos.

No interior destes frascos foi vertida uma camada de meio BDA pH 6,8 com adição de ácido nalidíxico (100 µg/mL) e cilindros de micélio do isolado LGMF1254 foram inoculados na extremidade dos frascos.

O fruto infectado foi depositado no interior dos potes sobre a base de placas de Petri, sem contato com o meio de cultura e o endofítico. Os potes foram tampados e mantidos em câmara de germinação a 26 graus sob luz constante durante 30 dias. Após esse período, fotos foram tiradas sob as mesmas condições, com aumento de 16 vezes em microscópio estereoscópio. As lesões foram mensuradas através do software Meazure (<http://www.cthing.com>). O experimento foi realizado com 10 repetições.



FIGURA 2 – FRUTOS INOCULADOS COM O FITOPATÓGENO PARA INDUÇÃO DE LESÕES NO TRATAMENTO COM O ISOLADO LGMF1254 PRODUTOR DE VOLÁTEIS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

Fonte: o autor

4.6 ANÁLISE DO VOLÁTIL NA FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS

Para avaliar a interferência provocada pelos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254 na formação de picnídios, foi realizado um ensaio utilizando placas de Petri com divisória. Em um dos compartimentos foi vertido meio completo com pH 6,8 e, posteriormente foi inoculado um cilindro de micélio de 6 mm de diâmetro do endófito. No outro compartimento foi depositada uma camada de ágar água e sobre este, cilindros de folha de citros com 10 mm de diâmetro. Nas extremidades das folhas foi inoculado fragmentos miceliais de *Phyllosticta citricarpa* (Figura 3).

A análise foi realizada mediante contagem dos picnídios formados sobre os fragmentos de folhas, em comparação com o grupo controle, onde não houve a inoculação do isolado LGMF1254.

Como controle negativo foi aplicado 10 μ L de solução de Carbendazim em concentração de 1,0 mg/mL sobre os cilindros de folhas de citros e posteriormente efetuou-se o inóculo de micélio de *P. citricarpa* nas extremidades foliares. A contagem foi realizada 14 dias após o início do tratamento e os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por teste LSD a 5% de probabilidade.

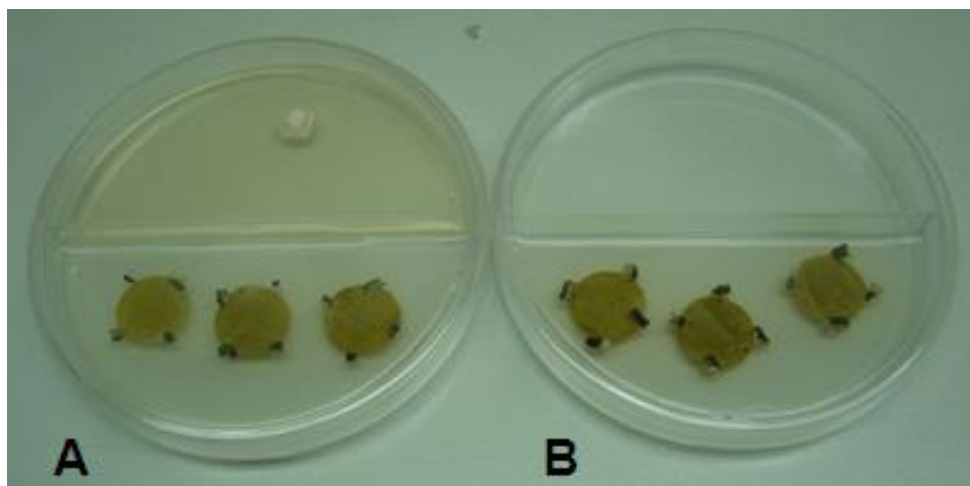


FIGURA 3 - INFLUÊNCIA DA AÇÃO DO COMPOSTO VOLÁTIL PRODUZIDO PELO ISOLADO LGMF1254 NO DESENVOLVIMENTO DE PICNÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa* EM FOLHAS DE CITROS

Nota: em A os fragmentos miceliais de *P. citricarpa* são expostos à atmosfera do isolado LGMF1254 e em B o grupo controle, sem a presença do isolado.

Fonte: o autor

4.7 ANÁLISE DA VIABILIDADE DO INÓCULO UTILIZADO NO TESTE DE PICNÍDIOS APÓS O TRATAMENTO

Para conferir a viabilidade do inóculo de *Phyllosticta citricarpa* após o tratamento, fragmentos de 2 mm utilizados no teste de formação de pycnidios (os mesmos que foram colocados nas bordas das folhas) foram transferidos para novas placas contendo meio de cultura BDA pH 6.8 e mantidas em BOD a 28° C. O desenvolvimento foi comparado com a inoculação de cubos de mesma medida e de mesma origem utilizada para o teste de pycnidios. O teste foi realizado inoculando 6 fragmentos por placa, com 5 repetições. Os dados foram analisados pelo teste binomial de Fisher.

4.8 ANÁLISE DOS VOLÁTEIS NA FORMAÇÃO DE LESÕES EM FRUTOS PROPENSOS À DOENÇA

Os voláteis produzidos pelo endófito foram testados quanto à inibição dos sintomas em frutos oriundos de pomares com alto índice da doença MPC. Para tanto, foram utilizadas laranjas de pomares da cidade de Matão, São Paulo. Os frutos foram desinfestados externamente e depositados em potes plásticos transparentes. Em cada pote foram colocadas três laranjas e três placas de Petri com inóculo do isolado LGMF1254 em meio BDA pH 6.8. Estas placas foram deixadas abertas, mas sem contato com os frutos (Figura 4). Os potes foram vedados e mantidos em câmara de germinação a 26 graus sob luz constante. Para o grupo controle procedeu-se da mesma forma, porém, sem a deposição das placas com inóculo. O experimento foi realizado com 5 repetições. Após 21 dias, o número de lesões foi contado e os valores obtidos analisados através do teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.



FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DOS FRUTOS E INÓCULOS PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ISOLADO LGMF1254 NA FORMAÇÃO DE LESÕES EM FRUTOS DE REGIÕES COM ALTO ÍNDICE DA MANCHA PRETA DO CITROS

Fonte: o autor

5 RESULTADOS

5.1 CULTURA PAREADA

A análise do diâmetro das colônias do fitopatógeno após 14 dias demonstrou que o isolado LGMF1254 interfere no crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*, inibindo em média 69,9% o diâmetro da colônia. Os isolados número 45 (*Phanerochaete* sp), 14 (*Neofusicoum* sp), 07 (*Nigrospora* sp), 23 (*Colletotrichum* sp) e 1075 (*Bionectria* sp) apresentaram inibição acima de 50%. Para os demais isolados, a inibição foi inferior a 50% nos testes de cultura pareada. A porcentagem de inibição aos 7 e 14 dias de tratamento de todos os isolados está descrita na tabela 01. Nesta tabela também estão descritos a origem dos isolados, a temperatura e o pH do meio utilizados para o isolamento.

Com exceção dos isolados 6, 31, 36, 37, 43, 52 e 54, todos os demais apresentaram inibição significativa quando comparados com o grupo controle (teste Kruscal-Wallis 5%). O posto ocupado pelo LGMF1254, embora tenha diferido do controle negativo, foi superior a todos os demais isolados (Apêndice 1.2).

Na Figura 05 é possível observar que a inibição ocorre por fatores variados, incluindo a produção de metabólitos voláteis (B), liberação de metabólitos no meio de cultura (C) e competição por nutrientes e espaço. O crescimento rápido dos isolados D, E, F e G torna-se desvantajoso para *P. citricarpa*, e acarreta um menor crescimento micelial.

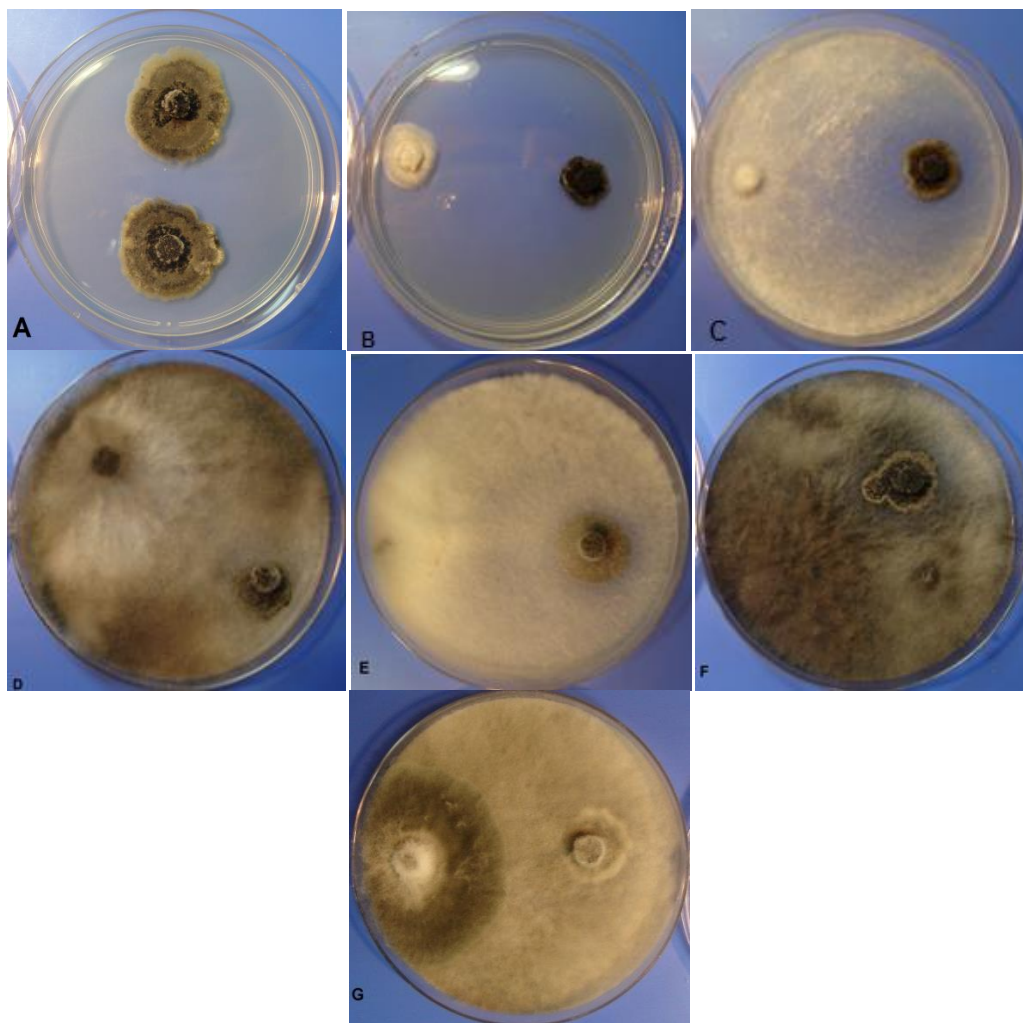


FIGURA 5 - CULTURA PAREADA EM MEIO COMPLETO PH 6,8 APÓS 14 DIAS DE TRATAMENTO A 28° C

Nota: Em A o Controle positivo de crescimento micelial de *P. citricarpa*; Os seguintes fungos foram confrontados com *P. citricarpa* conforme a sequência: B LGMF1254; C *Phanerochaete* sp; D *Colletotrichum* sp; E *Nigrospora* sp; F *Neofusicoum* sp; G *Bionectria* sp.

Fonte: o autor

TABELA 1 - POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CITROS SOBRE O PATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* MEDIANTE CULTURA PAREADA AOS SETE E QUATORZE DIAS DE TRATAMENTO (CONTINUA)

Isolado	Origem	Temperatura isolamento (° C)	pH	Inibição 7 dias (%)	Inibição 14 dia (%)	Identificação
1	Floraí	35	5.8	0.69	18.3	<i>Colletotrichum</i> sp*
2	Floraí	28	6.8	5.44	12.9	
3	Floraí	28	5.8	41.06	14.4	
4	Cruzeiro do Sul	22	6.8	11.27	30.6	
6	Cruzeiro do Sul	22	5.8	5.01	6.9	<i>Acremonium</i> sp *
7	Cruzeiro do Sul	22	5.8	36.96	53.4	<i>Nigrospora</i> sp **
9	Cruzeiro do Sul	22	6.8	5.44	16.7	<i>Alternaria</i> sp *
10	Cruzeiro do Sul	22	6.8	11.92	32.5	<i>Colletotrichum</i> sp*
11	Cruzeiro do Sul	28	6.8	21.63	37.8	
12	Cruzeiro do Sul	35	5.8	9.33	18.7	
13	Cruzeiro do Sul	28	6.8	5.01	29.8	
14	Cruzeiro do Sul	28	6.8	34.37	54.7	<i>Neofusicoum</i> sp **
15	Cruzeiro do Sul	22	5.8	14.51	33.7	<i>Colletotrichum</i> sp*
16	Cruzeiro do Sul	28	6.8	9.33	28.2	
17	Cruzeiro do Sul	35	6.8	11.92	31.7	
18	Cruzeiro do Sul	28	5.8	24.22	40.7	
19	Cruzeiro do Sul	22	6.8	10.62	29.2	
20	Cruzeiro do Sul	28	6.8	15.16	35.9	
21	Altônia	28	5.8	8.03	24.4	<i>Colletotrichum</i> sp*
22	Altônia	28	6.8	11.92	27.9	<i>Colletotrichum</i> sp*
23	Altônia	28	5.8	37.82	50.2	<i>Colletotrichum</i> sp **
24	Floraí	35	6.8	13.21	31.6	<i>Colletotrichum</i> sp *
25	Floraí	22	5.8	7.38	17.2	
26	Floraí	28	5.8	5.44	18.7	<i>Colletotrichum</i> sp *
27	Floraí	28	5.8	14.51	30.6	<i>Colletotrichum</i> sp *
28	Floraí	22	6.8	19.69	41.1	<i>Fusarium</i> sp*
29	Floraí	22	5.8	13.21	33	
30	Floraí	28	6.8	12.56	35.9	

Nota: * Identificação morfológica

** Identificação por sequenciamento

TABELA 1 - POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CITROS SOBRE O PATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* MEDIANTE CULTURA PAREADA AOS SETE E QUATORZE DIAS DE TRATAMENTO (Continuação)

Isolado	Origem	Temperatura isolamento (° C)	pH	Inibição 7 dias (%)	Inibição 14 dia (%)	Identificação
31	Floraí	35	6.8	8.03	9.4	<i>Colletotrichum</i> sp *
32	Floraí	28	6.8	17.1	27.3	
33	Floraí	22	6.8	14.51	35.9	<i>Colletotrichum</i> sp *
34	Floraí	28	6.8	13.86	13.9	
35	Alto Paraná	22	5.8	14.51	26.3	<i>Colletotrichum</i> sp *
36	Alto Paraná	28	6.8	5.44	2.4	
37	Alto Paraná	28	6.8	10.62	9.1	
38	Alto Paraná	28	5.8	11.27	32.5	<i>Colletotrichum</i> sp *
39	Alto Paraná	28	5.8	0.91	12	<i>Aspergillus</i> sp*
40	Cruzeiro do Sul	28	5.8	6.74	17.2	
41	Cruzeiro do Sul	22	5.8	6.09	10.5	
42	Cruzeiro do Sul	28	6.8	11.92	31.7	
43	Cruzeiro do Sul	28	6.8	4.15	8.8	<i>Pestalotiopsis</i> sp *
44	Cruzeiro do Sul	28	6.8	25.52	45.9	<i>Aspergillus</i> sp *
45	Cruzeiro do Sul	28	6.8	54.02	60.3	<i>Phanerochaete</i> sp **
46	Cruzeiro do Sul	22	5.8	10.19	13.2	
47	Cruzeiro do Sul	35	6.8	22.28	43.1	
48	Guairaçá	22	6.8	19.04	36.8	<i>Colletotrichum</i> sp *
49	Guairaçá	28	6.8	20.55	39.4	
50	Guairaçá	35	5.8	8.03	31.1	<i>Colletotrichum</i> sp *
51	Guairaçá	28	5.8	15.8	37.8	
52	Guairaçá	22	5.8	-1.68	-0.5	
53	Guairaçá	35	6.8	18.39	36.4	
54	Guairaçá	28	5.8	6.09	6.7	
55	Guairaçá	35	6.8	15.16	28.2	
56	Guairaçá	35	5.8	7.38	13.4	
57	Guairaçá	35	5.8	12.56	32.5	<i>Colletotrichum</i> sp*
58	Guairaçá	28	6.8	27.46	46.4	
59	Guairaçá	35	5.8	22.93	35.9	
60	Guairaçá	35	6.8	17.75	37.3	<i>Colletotrichum</i> sp*

Nota: * Identificação morfológica

** Identificação por sequenciamento

TABELA 1 - POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CITROS SOBRE O PATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* MEDIANTE CULTURA PAREADA AOS SETE E QUATORZE DIAS DE TRATAMENTO (Continuação)

Isolado	Origem	Temperatura isolamento (° C)	pH	Inibição 7 dias (%)	Inibição 14 dia (%)	Identificação
61	Guairacá	35	6.8	17.96	37.5	<i>Helminthosporium</i> sp*
62	Guairacá	28	6.8	17.96	21.5	
63	Guairacá	28	6.8	24.87	40	<i>Colletotrichum</i> sp *
64	Guairacá	35	5.8	18.39	36.4	
LGMF1254	Guairacá	28	5.8	60.49	69.9	
66	Alto Paraná	28	5.8	14.51	20.1	
67	Cruzeiro do Sul	35	5.8	13.86	26.8	
68	Alto Paraná	22	5.8	13.21	35.4	
1068	Cruzeiro do Sul	35	5.8	7.6	27.9	
1075	Cruzeiro do Sul	35	5.8	33.51	50.2	<i>Bionectria</i> sp **

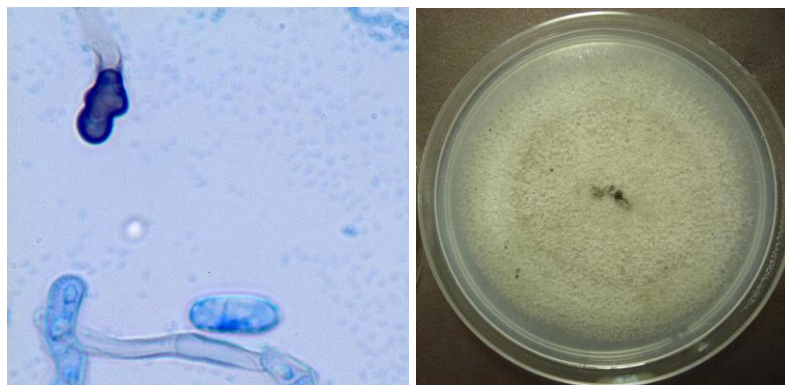
Nota: * Identificação morfológica

** Identificação por sequenciamento parcial de ITS

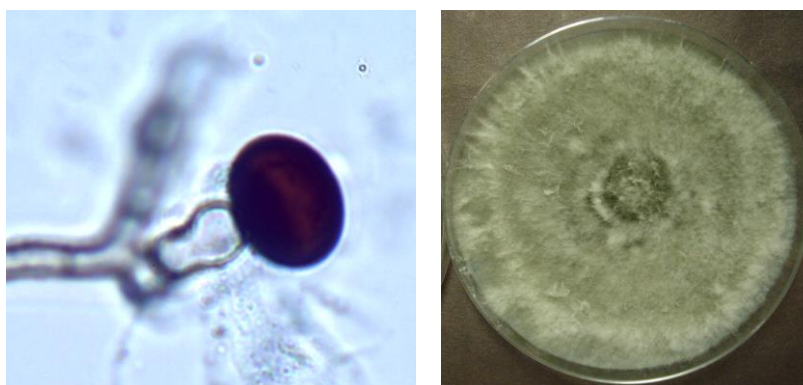
5.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Através do microcultivo alguns fungos desenvolveram estruturas de reprodução que permitiram inferir a qual gênero os isolados pertencem. Houve predominância de fungos do gênero *Colletotrichum*. Os gêneros *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Nigrospora* e *Aspergillus* foram evidenciados.

Na figura 6 estão evidenciadas as estruturas de reprodução dos isolados e a morfologia das colônias quando desenvolvidas em meio BDA pH 6,8 após 10 dias.



Isolado 01 (*Colletotrichum* sp)

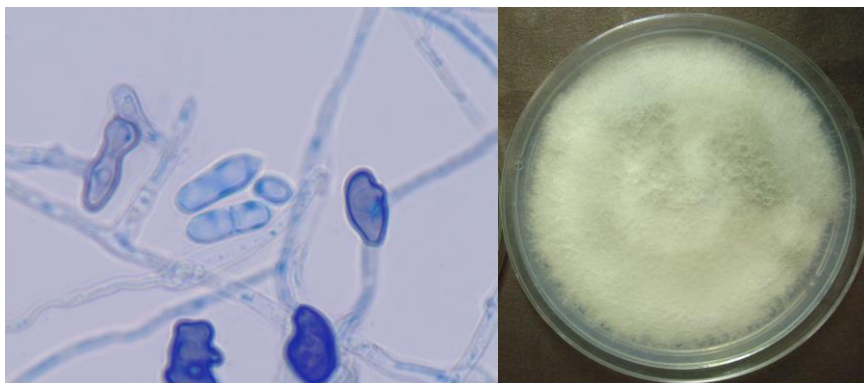


Isolado 07 (*Nigrospora* sp)



Isolado 09 (*Alternaria* sp)

FIGURA 6 - MORFOLOGIA DAS COLONIAS E ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO
(Continua)



Isolado 24 (*Colletotrichum* sp)

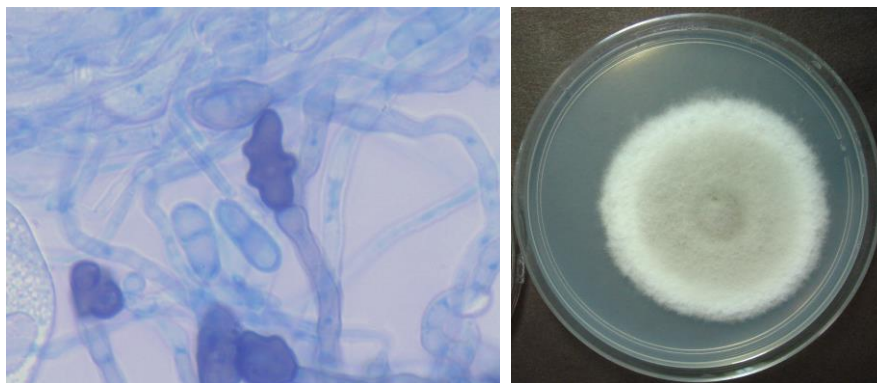


Isolado 27 (*Colletotrichum* sp)

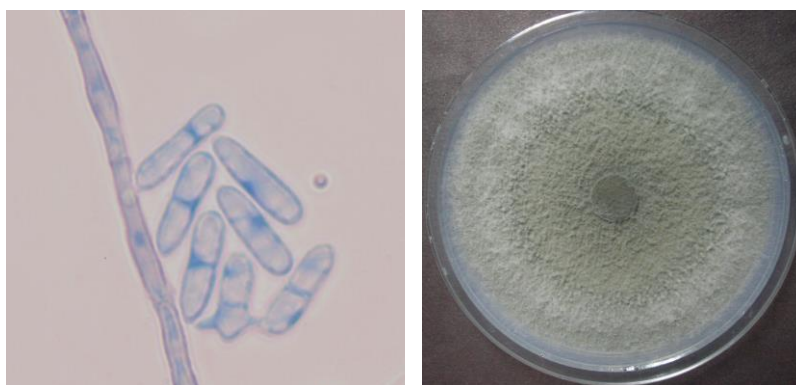


Isolado 28 (*Fusarium* sp)

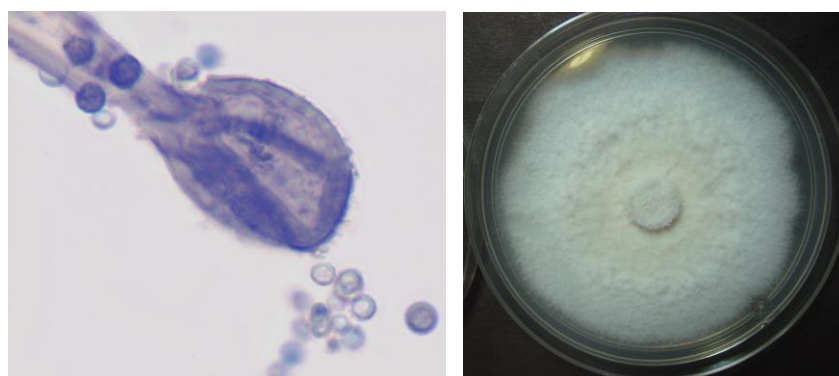
FIGURA 6 – MORFOLOGIA DAS COLONIAS E ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO APÓS 10 DIAS EM MEIO BDA PH 6,8 (Continuação)



Isolado 33 (*Colletotrichum* sp)

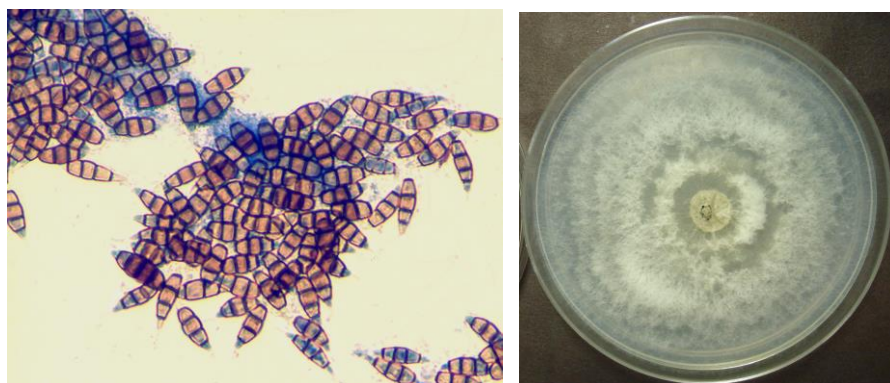


Isolado 35 (*Colletotrichum* sp)

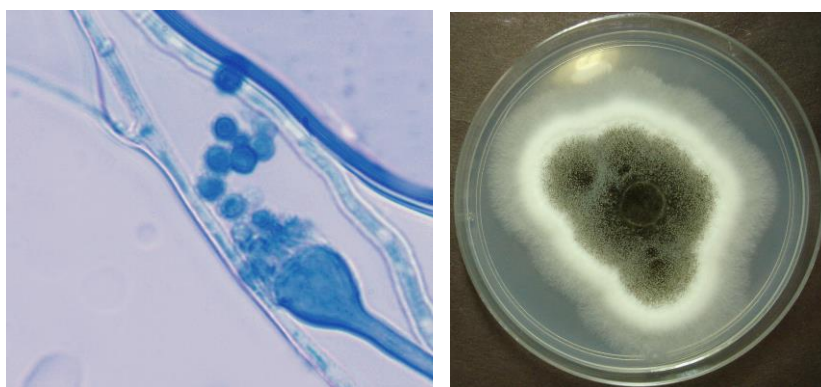


Isolado 39 (*Aspergillus* sp)

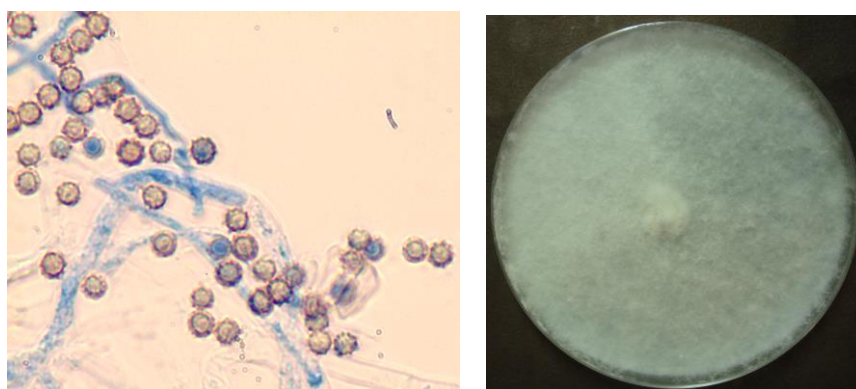
FIGURA 6 – MORFOLOGIA DAS COLONIAS E ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO APÓS 10 DIAS EM MEIO BDA PH 6,8 (Continuação)



Isolado 43 (*Pestalotiopsis* sp)

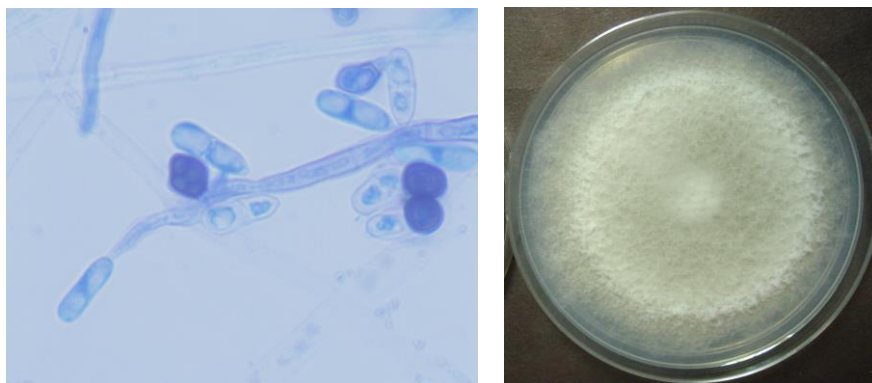


Isolado 44 (*Aspergillus* sp)

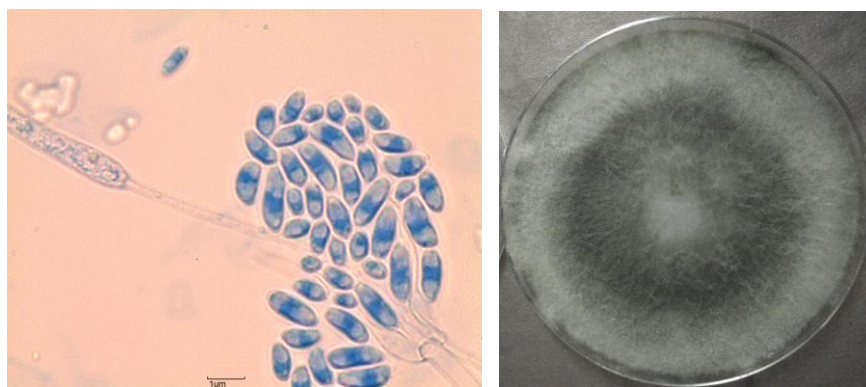


Isolado 45 (*Phanerochaete* sp)

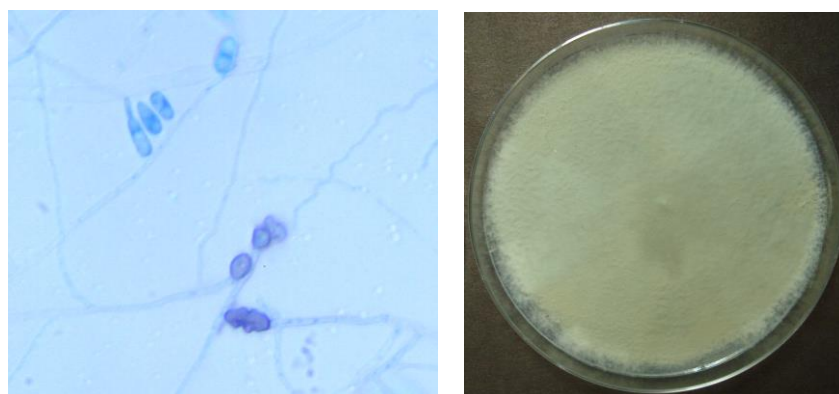
FIGURA 6 – MORFOLOGIA DAS COLONIAS E ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO APÓS 10 DIAS EM MEIO BDA PH 6,8 (CONTINUAÇÃO)



Isolado 48 (*Colletotrichum* sp)

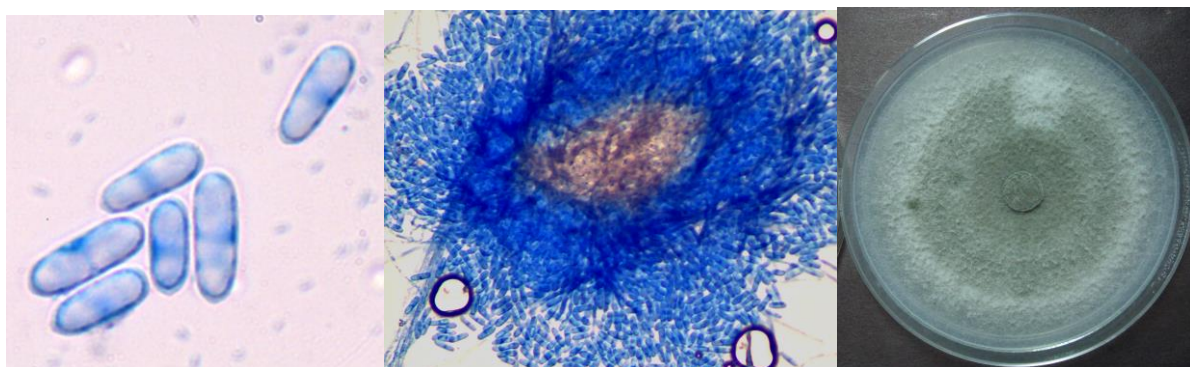


Isolado 1075 (*Bionectria* sp)

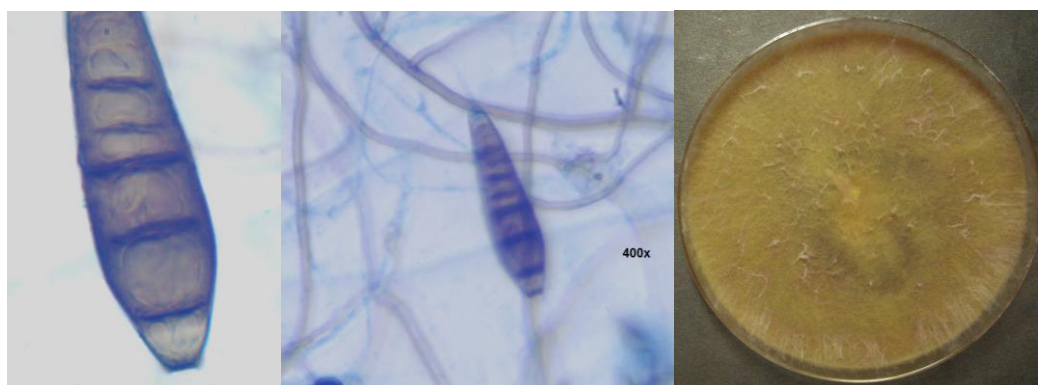


Isolado 67 (*Colletotrichum* sp)

FIGURA 6 – MORFOLOGIA DAS COLONIAS E ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO APÓS 10 DIAS EM MEIO BDA PH 6,8 (CONTINUAÇÃO)



Isolado 60 (*Colletotrichum* sp)



Isolado 61 (*Helminthosporum* sp)

FIGURA 6 – MORFOLOGIA DAS COLONIAS E ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO APÓS 10 DIAS EM MEIO BDA PH 6,8 (CONTINUAÇÃO)

5.3 TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

Na Tabela 2 estão relacionados os dez isolados com maiores valores de inibição no teste de metabólitos voláteis. Os dados referentes ao 7º dia e valores de inibição inferiores a 20% estão expressos na íntegra no Apêndice 2. O crescimento micelial de alguns isolados transpassou a divisória da placa aos 14 dias e, portanto, não constam na análise.

TABELA 2 INIBIÇÃO DE *P. citricarpa* POR METABÓLITOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CITROS APÓS 14 DIAS DE TRATAMENTO INOCULADOS EM MEIO COMPLETO PH 6,8 A 28° C

Isolado	Inibição (%)	Média	Variância	SD	Grupo
Controle -	100.00	0.0	0.0	0.0	X
LGMF1254	60.39	10.25	28.25	5.31507	X
3	32.37	17.5	2.25	1.5	X
51	31.72	17.6667	10.3333	3.21455	XX
1	29.79	18.1667	2.5833	1.60728	XXX
44	25.93	19.1667	0.583333	0.763	XXXX
1068	23.35	19.8333	0.583333	0.763763	XXXXX
4	22.71	20.0	3.0	1.73205	XXXXX
15	22.06	20.1667	3.58333	1.89297	XXXXXX
11	20.77	20.5	1.0	1.0	XXXXXX
13	20.77	20.5	3.0	1.73205	XXXXXX

p-value = $1,38176^{-7}$

Embora todos os isolados tenham exercido inibição, o LGMF1254 inibiu em 60% o diâmetro médio das colônias de *P. citricarpa*, sendo o isolado mais promissor (Figura 7). Relevância encontrada também no teste de cultura pareada, indicando que o fator responsável pela diminuição do crescimento micelial seja de natureza volátil.

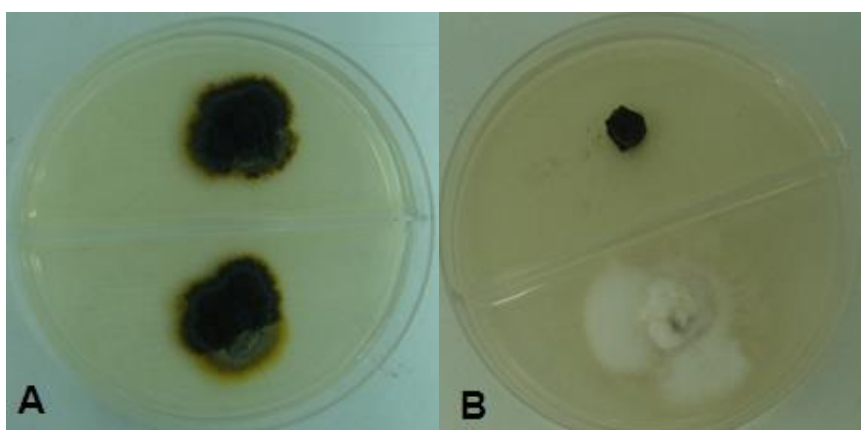


FIGURA 7 - TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS REVELANDO INIBIÇÃO DE *P. citricarpa* PELOS COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254 APÓS 14 DIAS EM MEIO COMPLETO PH 6,8.

Nota: Em A o fungo sem tratamento e em B o crescimento na presença do isolado LGMF1254

O isolado LGMF1254, mesmo apresentando os maiores desvios, teve maior influência na inibição do crescimento de *P. citricarpa* com inibição diferencial frente aos demais tanto no 7^o quanto no 14^o dia segundo teste LSD (apêndice 2.3 e 3.3).

5.4 INIBIÇÃO POR METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS

Os resultados obtidos no teste de metabólitos não voláteis condizem com os obtidos pelos demais testes de antagonismo. Os isolados 45 (*Phanerochaete sp*), 14 (*Neofusicoccum sp*) e 07 (*Neurospora sp*) apresentaram bons resultados, correspondente com o teste de cultura pareada, indicando que estes fungos produzem e liberam compostos no meio de cultura, e que estes metabólitos inibem o crescimento micelial de *P. citricarpa*. Os valores de inibição para os isolados 1075, 58 e 23 foram menores quando comparados com os valores encontrados no teste de cultura pareada. Esta diferença pode ser relacionada à inibição devido ao rápido crescimento destes sobre o patógeno, impedindo ou consumindo os nutrientes do confrontante. O isolado LGMF1254 demonstrou ação inibitória por metabólitos difusíveis no meio de cultura com valores pouco expressivos (14,2 %), portanto, indicando que os resultados evidenciados nos testes de antagonismo anteriores, eram de fato, devido à ação de voláteis (tabela 3).

A metodologia utilizada para fumigação das células remanescentes demonstrou interferir no crescimento de *P. citricarpa* ($p \text{ value} = 1.81323E^{-8}$). O controle tratado com clorofórmio teve crescimento inferior às colônias ausentes do solvente, portanto, as análises foram baseadas no grupo desenvolvido na presença de clorofórmio. Na tabela 3 estão expostas as distribuições dos valores referentes ao diâmetro e a porcentagem de inibição de *P. citricarpa* mediante o tratamento com cada isolado.

TABELA 3 - CRESCIMENTO MICELIAL DE *P. citricarpa* MEDIANTE TESTE DOS METABÓLITOS DIFUSÍVEIS NO MEIO DE CULTURA (VALORES EM PORCENTAGEM)

Tratamento	Inibição (%)	grupo	Média (mm)	Variância	Desvio Padrão
Controle -	99.1	a	0.0833	0.0417	0.20412
45	60.9	b	4.3333	0.5417	0.73598
7	60.9	b	4.3333	1.2917	1.13652
14	51.5	b	5.375	1.19375	1.09259
23	33.0	c	7.4166	0.467	0.68313
1075	32.3	c	7.5	0.775	0.88034
58	18.0	d	9.0833	3.0167	1.73686
LGMF1254	14.3	d	9.5	3.75	1.93649
Controle+ (clor)		e	11.0833	0.77	0.87559
Controle+		f	16.7917	3.46042	1.86022

P-Value = 1.81323^{-8}

Nota: Na coluna grupo, letras iguais não apresentam diferença significativa segundo teste LSD com 5% de probabilidade.

Legenda: C+ = controle positivo (*P. citricarpa* apenas); C- = controle negativo (Carbendazim); Clor = controle do clorofórmio.

5.5 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO ITS

Os seis isolados com maiores valores de inibição à *P. citricarpa* nos testes de cultura pareada foram sequenciados utilizando a região ITS1- 5,8S- ITS2 do DNA ribossomal.

Comparando-se as sequências obtidas com as depositadas no banco de dados NCBI, o isolado LGMF1254 apresentou similaridade de 100% com duas sequências relativas à *Fusarium polyfalidicum* (HM999904) e (FJ884098) e uma espécie *Fusarium sp* (JN418788). A árvore baseada no modelo Máxima Verossimilhança agrupou o LGMF1254 com as sequências acima descritas acima, com suporte de 99% (Figura 8).

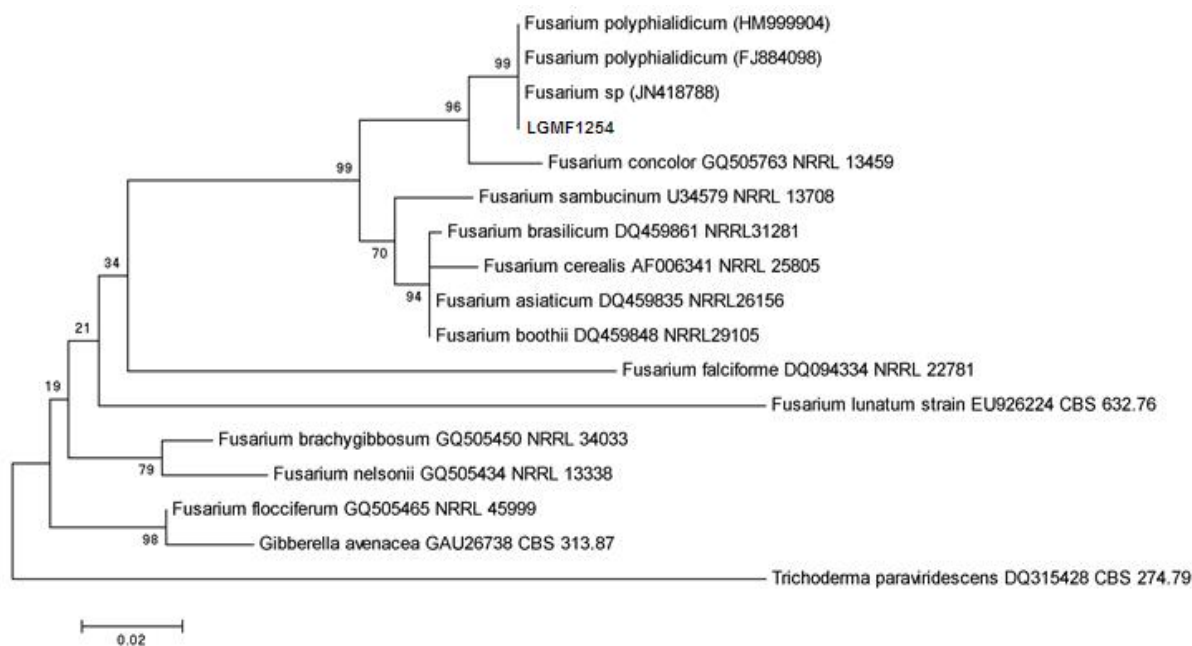


FIGURA 8 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO ISOLADO E SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO BANCO DE DADOS DO NCBI.

Nota: Dados gerados por máxima verossimilhança com repetições de 1.000 reamostragens.

O isolado 1075 apresentou 98% de similaridade com a sequência depositada no GenBank com número HQ115730 e referente à *Bionectria ochroleuca*. O agrupamento segundo método da Máxima verossimilhança apresentou suporte de 99% (Figura 9).

O Isolado 07 apresentou similaridade com a sequência relacionada à *Nigrospora* sp (JX559554) com valores de 97%. A árvore filogenética, no entanto, fornece pouco suporte a este agrupamento (Figura 10).

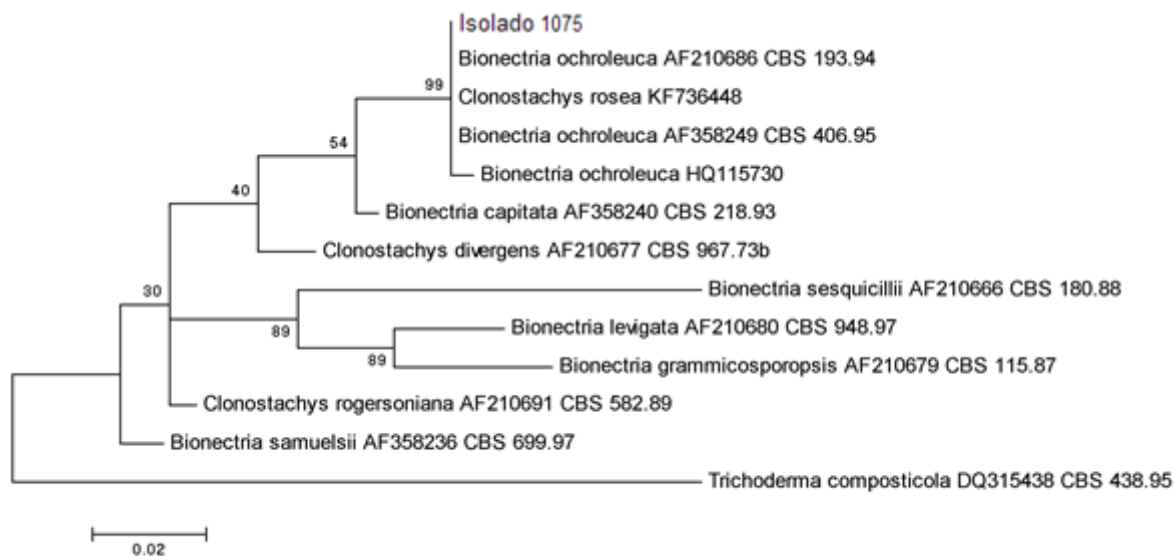


FIGURA 9 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO ISOLADO E SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO BANCO DE DADOS DO NCBI

Nota: Dados gerados por máxima verossimilhança com repetições de 1.000 amostragens.

O isolado 23 apresentou similaridade de 94% com a sequência depositada no NCBI sob o código JX010148, este, relacionado à espécie *Colletotrichum gloeosporioides*. Entretanto, o baixo valor de suporte apresentado pelo agrupamento gerado pelo método da Máxima Verossimilhança, não permite identificar qual é a espécie (Figura 11).

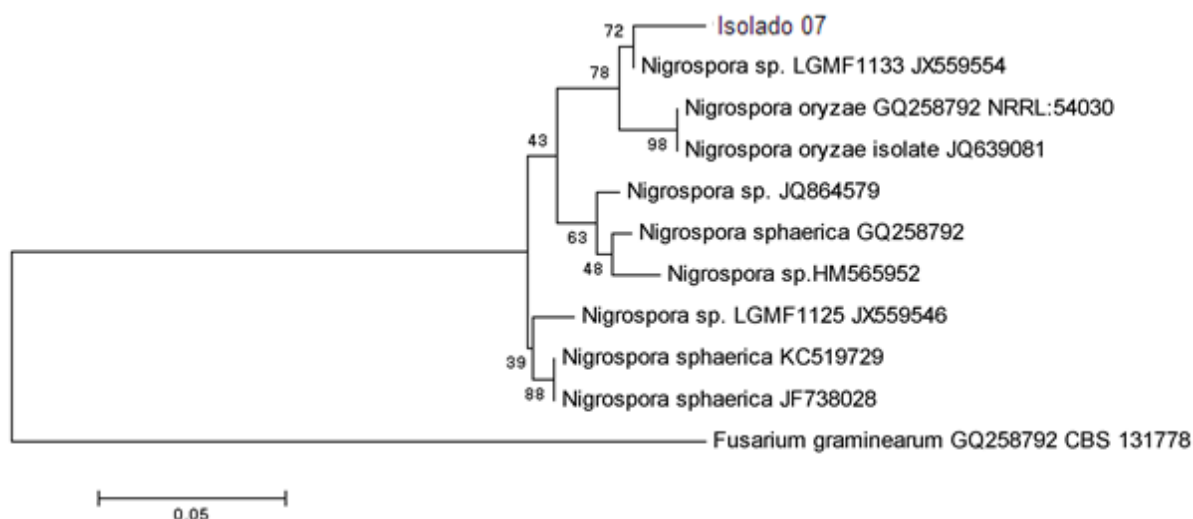


FIGURA 10 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO ISOLADO E SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO BANCO DE DADOS DO NCBI.

Nota: Dados gerados por máxima verossimilhança com repetições de 1.000 reamostragens

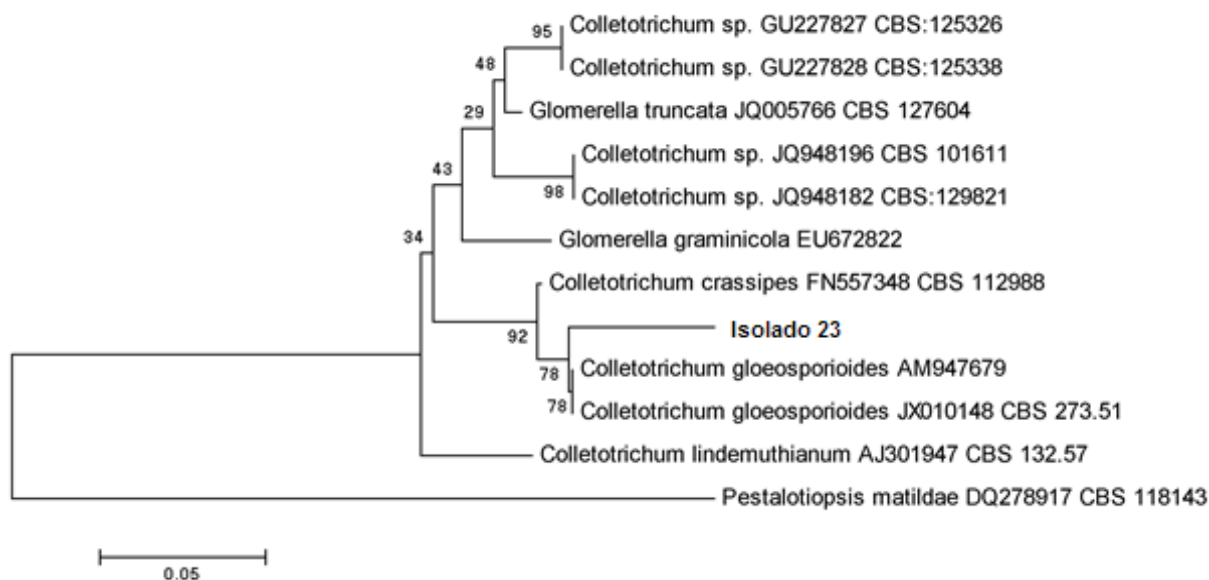


FIGURA 11 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO ISOLADO E SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO BANCO DE DADOS DO NCBI.

Nota: Dados gerados por máxima verossimilhança com repetições de 1.000 reamostragens

As sequências referentes ao isolado 45 apresentaram 96% de similaridade com os depósitos no Genbank de código GU966518, GQ280374 e HM171940 relacionados ao fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Os ramos gerados mediante o método de Máxima verossimilhança são inconsistentes e não permitiu inferir qual é a espécie em questão (Figura 12).

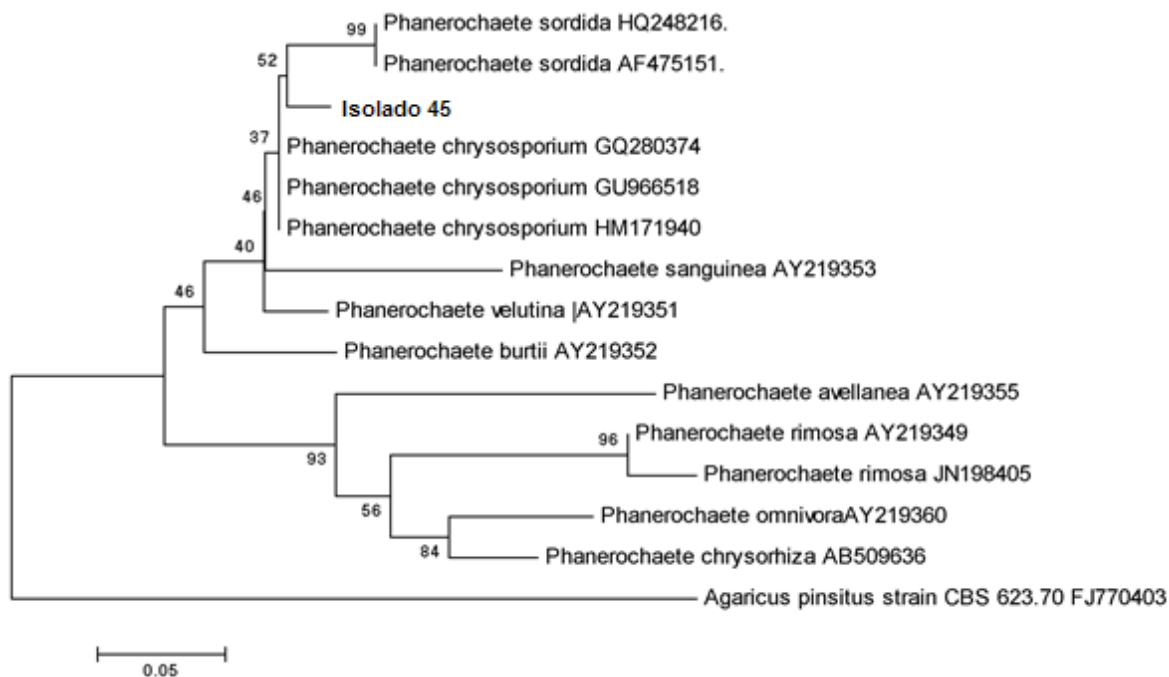


FIGURA 12 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO ISOLADO E SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO BANCO DE DADOS DO NCBI

O isolado 14 apresentou similaridade com a espécie *Neofusicoccum parvum* (JN135282) com índice de 96%. Entretanto não foi possível inferir qual é a espécie (Figura 13).

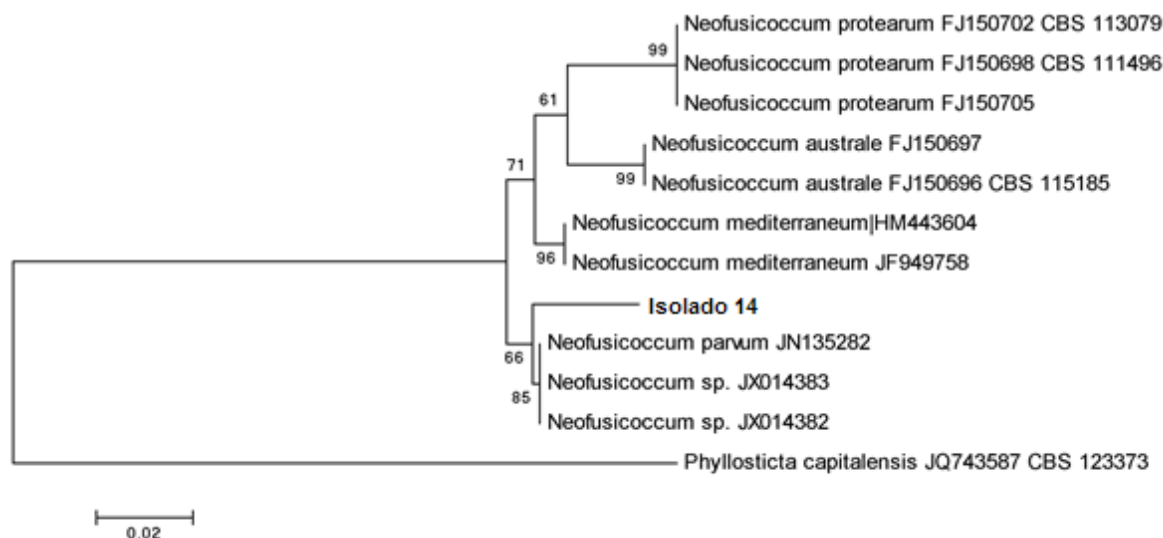


FIGURA 13 - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO rDNA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS DO ISOLADO E SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO BANCO DE DADOS DO NCBI

Nota: Dados gerados por máxima verossimilhança com repetições de 1000 reamostragens.

5.6 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DO COMPOSTO VOLÁTIL DO ISOLADO LGMF1254

A inibição diferencial de *P. citricarpa* perante os tratamentos foi considerada como resultado da influência do meio de cultura na produção dos voláteis.

A percentagem de inibição para todos os meios estão expressas na tabela 4 e representadas no Gráfico 1. Em todos os meios de cultura testados, o isolado LGMF1254 foi capaz de produzir os voláteis resultando na diminuição do diâmetro de *P. citricarpa*.

Do 7º ao 14º dia há maior inibição evidenciada nos meios BDA, Completo, Aveia, milho e MEA. Na análise aos 21 dias, com exceção do meio citros, todos igualmente permitiram a produção dos voláteis inibindo o diâmetro do crescimento micelial do fitopatógeno, com redução de 71,9% a 81,10 % (Gráfico 1).

TABELA 4 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE *P. citricarpa* PELO ISOLADO LGMF1254 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

	7 dias	10 dias	14 dias	21 dias
BDA	69.15	75.37	78.60	80.39
Completo	70.15	74.53	77.70	81.10
Aveia	66.42	71.19	75.54	80.04
Milho	62.93	68.06	72.85	73.67
MEA	61.69	68.27	72.67	75.80
Arroz	55.47	62.00	67.81	71.91
Citros	54.23	59.71	61.16	56.54

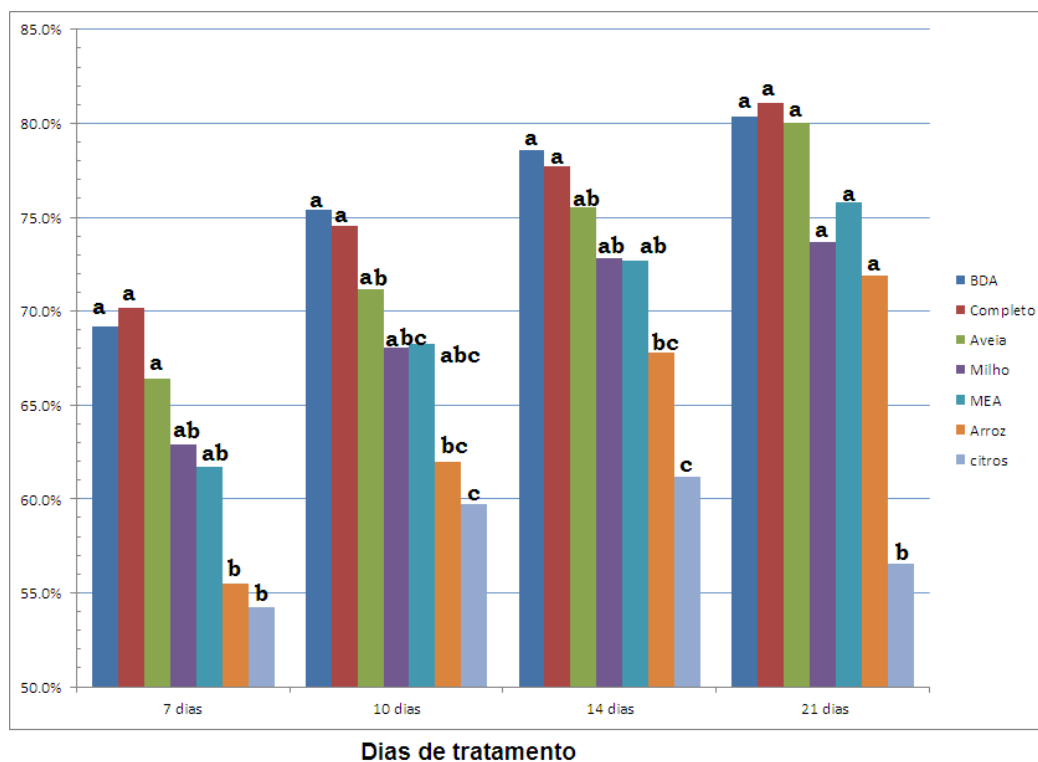


GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *P. citricarpa* PELOS COMPOSTOS VOLÁTEIS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Nota: Em cada grupo, valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente ao nível de 5% no teste LSD

Durante o experimento foi também possível analisar a morfologia da colônia do isolado LGMF1254 nos meios de cultura testados. No meio BDA e MEA o fungo

desenvolveu micélio cotonoso e espesso. No meio completo, as hifas penetraram no meio de cultura, desenvolvendo um micélio do tipo submerso, ao passo que em meio arroz e meio milho, o micélio desenvolveu-se rente ao substrato. Ao final do experimento, a partir do micélio desenvolvido em cada meio de cultura, foram montadas lâminas a fresco, porém, em nenhum dos meios o fungo produziu estruturas de reprodução (Figura 14).

O crescimento do isolado LGMF1254 foi avaliado em relação ao diâmetro da colônia nestes sete meios de cultura citados e o maior desenvolvimento após 14 dias foi observado em meio BDA. Não foi observada relação entre o diâmetro da colônia com a percentagem de inibição (Gráfico 02).

Os substratos mais eficientes (BDA, completo e aveia) foram submetidos à análise de variância e não demonstraram diferença significativa quanto à duração do tratamento. As inibições que os meios exercem no 7º dia não diferem do valor encontrado no 21º dia (Apêndice 6.6).

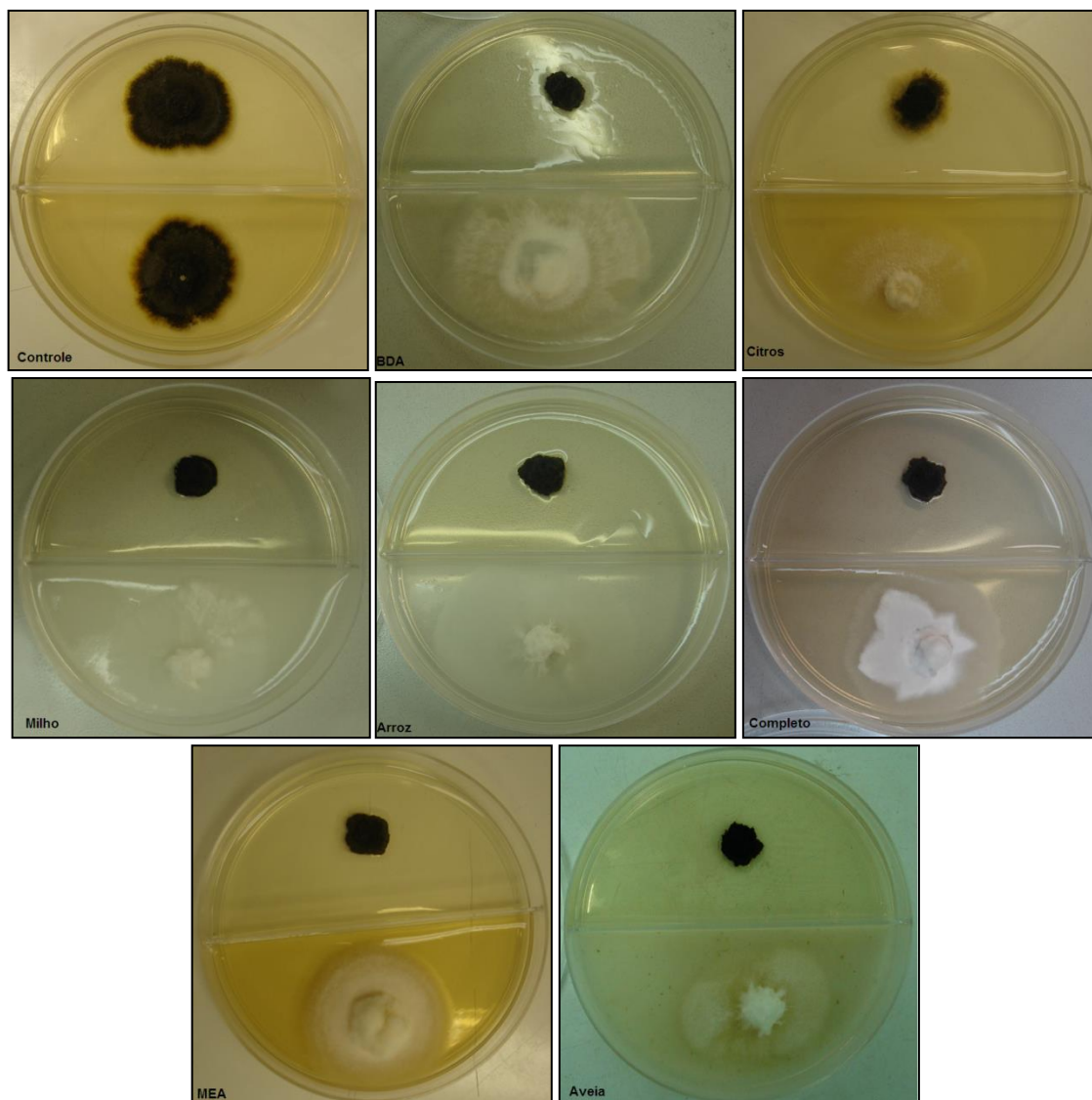


FIGURA 14 - TESTE DE INIBIÇÃO NO CRESCIMENTO DE *P. citricarpa* FRENTE AOS METABÓLITOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 21 DIAS DE TRATAMENTO EM PH 6,8 A 28° C

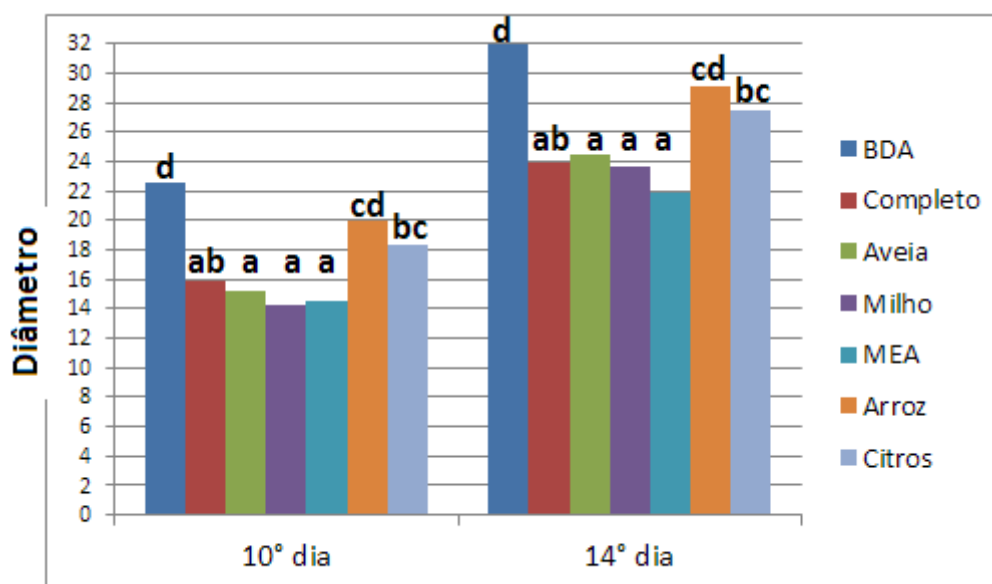


GRÁFICO 2 - DIÂMETRO MÉDIO DE CRESCIMENTO DO ISOLADO LGMF1254 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Nota: Para cada grupo, valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente no teste LSD ao nível de 5%.

5.7 INIBIÇÃO DE LESÕES INDUZIDAS EM FRUTOS MEDIANTE EXPOSIÇÃO A COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254

Os compostos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254, embora não tenham impedido o aparecimento das lesões nos frutos inoculados com o fitopatógeno, reduziram o diâmetro médio destas em 26,75% (valores calculados conforme Edington *et al.*, 1971) (Figura 15).

A análise estatística comprovou diferença significativa entre as médias dos controles de frutos verdes e amarelos, portanto, os dados referentes aos frutos amarelos (apenas um grupo) foram desconsiderados da análise seguinte. Entre os frutos amarelos e verdes do grupo tratamento, não houve diferença significativa, portanto, foram analisados em conjunto.

O diâmetro das lesões demonstrou uma distribuição normal, portanto foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com diferentes números de repetições, seguido pelo teste t. Pelos resultados foi possível demonstrar haver

diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade entre os frutos tratados e o controle.

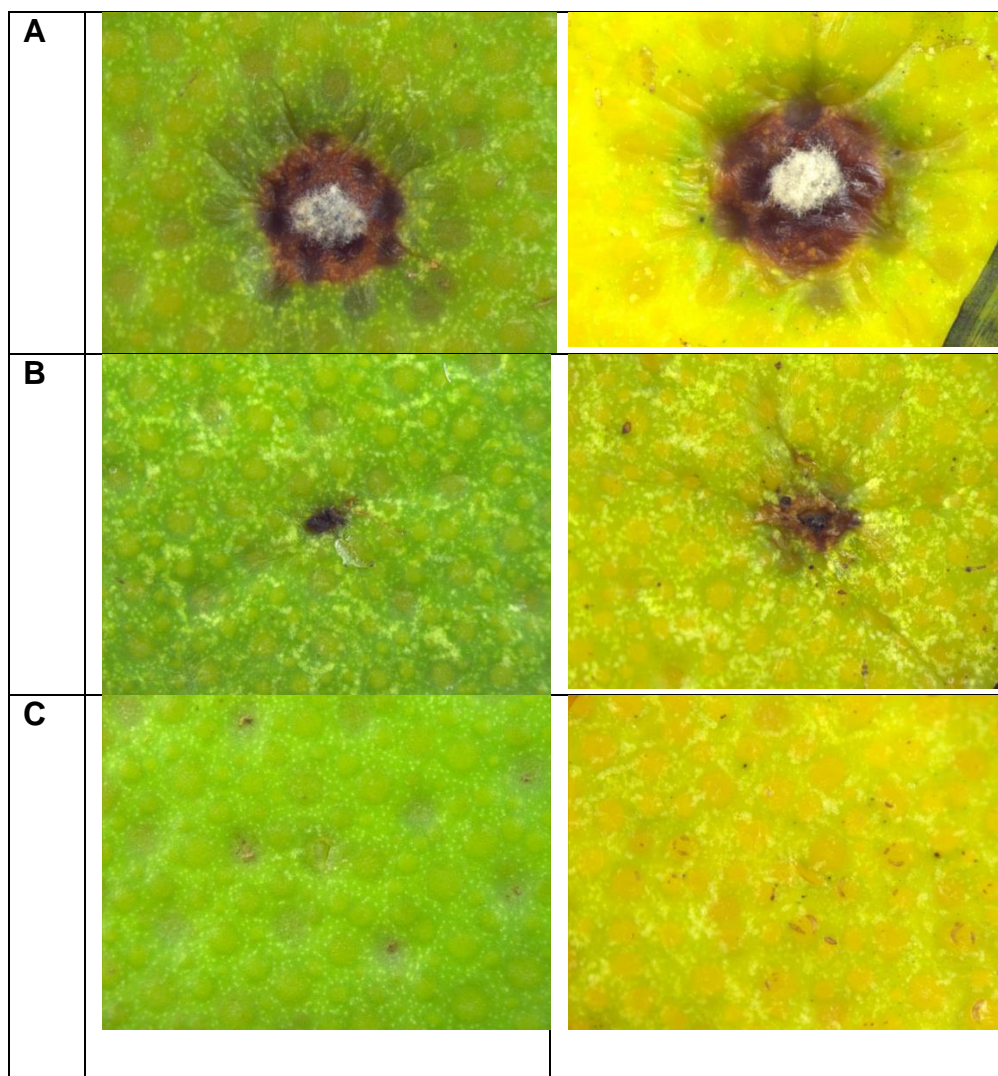


FIGURA 15 - LESÕES INDUZIDAS EM FRUTOS APÓS 31 DIAS DE TRATAMENTO

Notas: **A**- fruto inoculado com micélio de *P. citricarpa* por injúria; **B**- fruto inoculado com micélio de *P. citricarpa* por injúria mais o inóculo do isolado LGMF1254 no meio de cultura; **C**- apenas a injúria. Aumento de 16 vezes.

Foi verificado se a concentração do volátil estaria influenciando na ação sobre as lesões, portanto o volume dos potes foi mensurado pela seguinte fórmula: $V = (\pi \cdot h/3) \cdot (R^2 + Rr + r^2)$. Deste valor foi descontado o volume do meio de cultura

utilizado, ($V = \pi \cdot r^2 \cdot h$), e o volume dos frutos ($V = \frac{4}{3} \pi \cdot r^2$), onde “R” corresponde ao raio maior e “r” ao raio menor (BONJORNO; GIOVANNI *et al.*, 2002) (Tabela 5).

O volume fornecido para o desenvolvimento do fungo não pôde ser relacionado ao diâmetro médio das lesões (Tabela 6).

TABELA 5 - VOLUME DISPONÍVEL NO INTERIOR DOS POTES UTILIZADOS PARA O TESTE EM FRUTOS ORIUNDOS DE REGIÃO COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA

Fruto	Altura do meio cultura(cm)	Diâmetro do fruto (cm)	Raio	Volume ocupado pelo meio de cultura	Volume do fruto	Volume disponível (cm ³)
1T	1.20	6.15	3.075	94.2	39.5876	561.512
3T	1.10	6.05	3.025	86.4	38.3106	570.639
6T	1.30	7.00	3.500	102.1	51.2867	541.963
7T	1.30	7.25	3.625	102.1	55.0154	538.235
10T	1.00	7.35	3.675	78.5	56.5436	560.256

TABELA 6 - RELAÇÃO VOLUME DISPONÍVEL E TAMANHO DA LESÃO

Fruto	volume disponível	média lesão (mm)
3T	570.6394	4.955
7T	538.2346	6.139
10T	560.2565	6.643
6T	541.9633	7.14
1T	561.5125	7.177

5.8 TESTE DE FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHAS

Não foi observada a presença de picnídios sobre a superfície foliar em nenhuma das placas tratamento. No grupo controle negativo (carbendazim) foram

encontrados dois picnídios, porém, o valor não diferiu estatisticamente do tratamento com o volátil (p-value = 0.000002).

Na figura 16 é possível observar que o fungo *P. citricarpa* não se desenvolveu quando inoculado em conjunto com fragmentos do isolado LGMF1254 e, portanto, não houve a produção de picnídios. Este resultado foi encontrado em todas as placas que receberam tratamento.

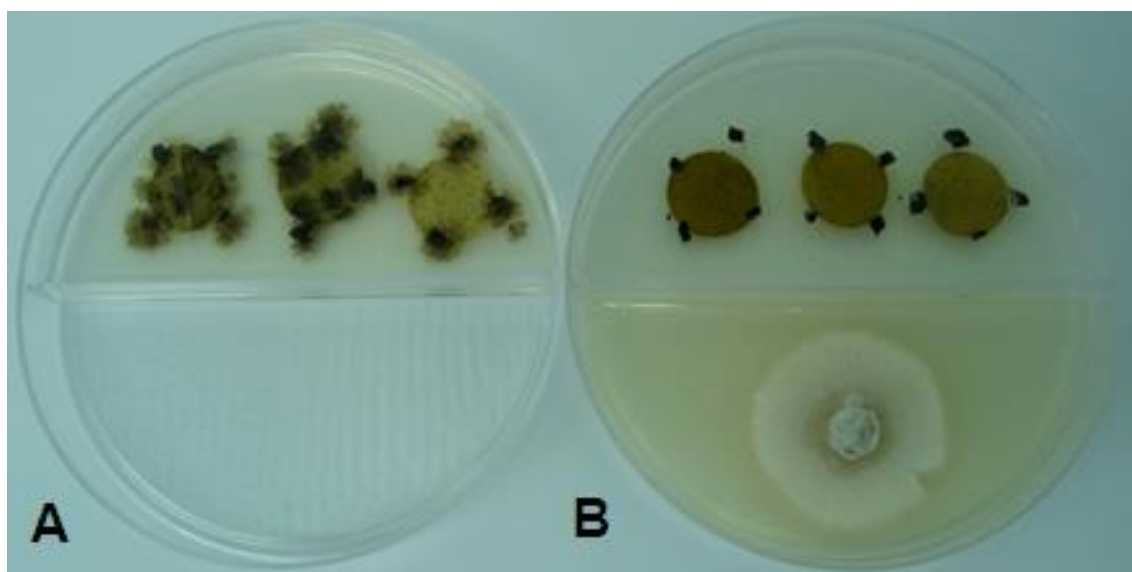


FIGURA 16 - EFEITO DOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254 EM FOLHAS DE CITROS INOCULADAS COM *P. citricarpa*.

Nota: em **A** o desenvolvimento de *P. citricarpa* e a formação de picnídios; em **B** o tratamento mostrando a ausência do desenvolvimento do fitopatógeno.

Na figura 17 **A** e **B** estão representantes dos tratamentos com Carbendazim e com o volátil produzido pelo isolado LGMF1254. Na figura 17 C, o grupo ausente de tratamento, evidencia o fragmento foliar coberto por picnídios. O mesmo é observado na figura 18, em **A** é possível observar que o fungo tratado com os voláteis sequer foi capaz de atingir o meio de cultura. Em **B** existe a formação dos picnídios tanto sobre a superfície foliar como sobre o meio de cultura.

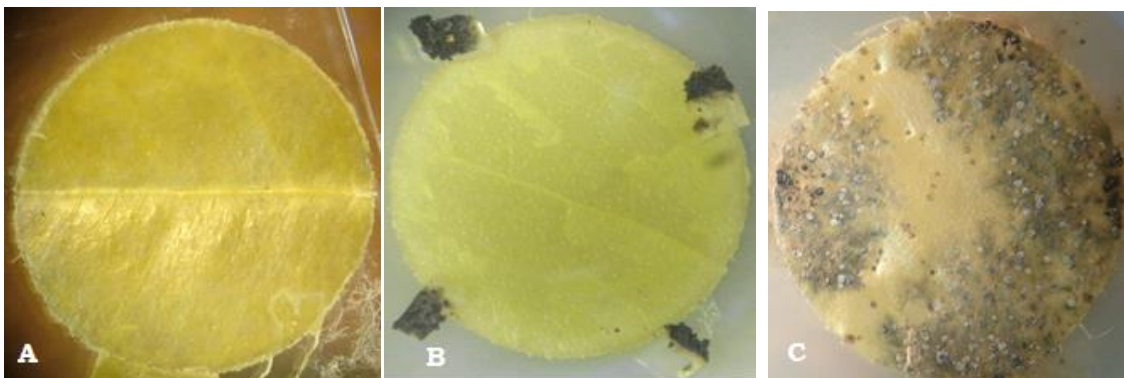


FIGURA 17 - EFEITO DOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254 NO DESENVOLVIMENTO DE PICNÍDIOS DE *P. citricarpa* EM FOLHAS.

Nota: **A** - controle negativo (Carbendazim); **B** – tratamento com LGMF1254 (ausência de picnídios devido aos voláteis do isolado), **C** - controle positivo (sem o isolado LGMF1254 e o antifúngico).

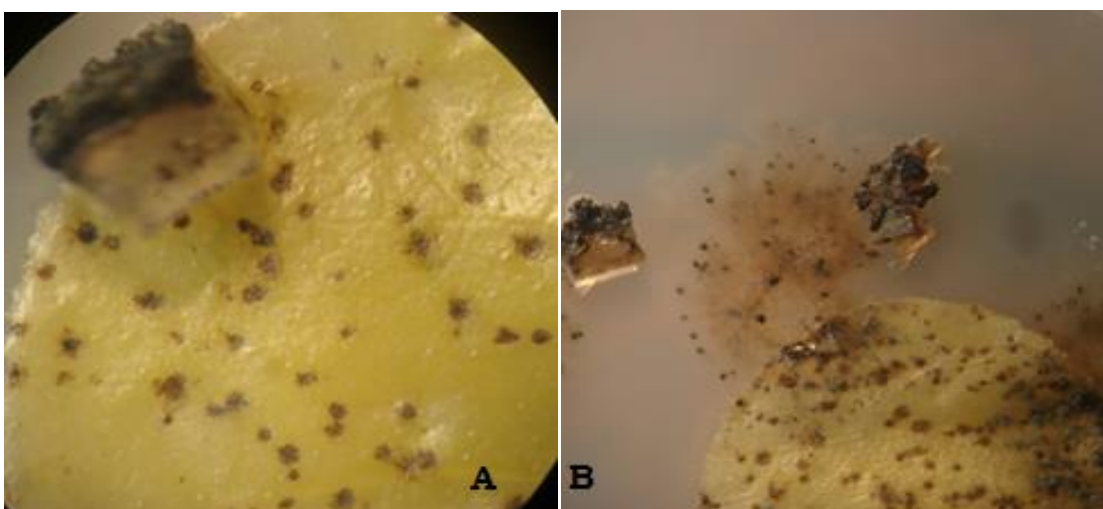


FIGURA 18 - ASPECTO DAS FOLHAS DE CITROS APÓS 14 DIAS DE TRATAMENTO (**A**) E NA AUSÊNCIA DO TRATAMENTO COM VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO ISOLADO LGMF1254 (**B**).

5.9 TESTE DA VIABILIDADE DOS FRAGMENTOS DE MICÉLIO DE *P. citricarpa* APÓS O TESTE DE PICNÍDIOS

Após o repique dos fragmentos de *P. citricarpa* retirados do teste anterior, foi verificado que apenas 3,333% dos fragmentos continuaram viáveis (1 dentre 30).

Todos os demais fragmentos não desenvolveram colônias do fitopatógeno (figura 19).

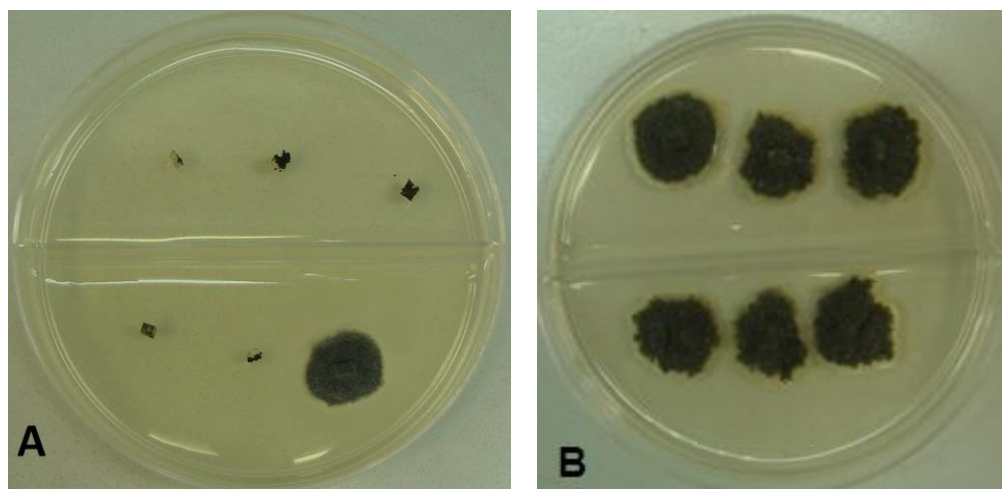


FIGURA 19 - DESENVOLVIMENTO DOS FRAGMENTOS MICELIAIS DE *P. citricarpa* RETIRADOS DO TESTE DE FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS APÓS 14 DIAS EM MEIO COMPLETO PH 6,8.

Nota: em **A** fragmentos de micélio retirados após o teste de inibição de picnídios; em **B** o controle de crescimento de *P. citricarpa*.

O tratamento foi eficiente em 96,666% dos fragmentos segundo teste binomial de Fisher ($p < 0,0001$ a 5%), indicando que o volátil possui ação não apenas fungistática, mas também fungicida ao patógeno.

5.10 EFEITO DOS VOLÁTEIS NA INIBIÇÃO DE SINTOMAS EM FRUTOS DE REGIÕES COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA

O composto volátil produzido pelo fungo isolado LGMF1254 não inibiu o aparecimento de lesões nos frutos oriundos de região com alta incidência da doença. Portanto, analisou-se os dados mediante o número de lesões evidenciadas em cada fruto.

O número de lesões nos frutos expostos aos compostos voláteis do isolado LGMF1254 não diferiu do grupo controle no teste de Mann-Whitney. Frutos com lesões severas e com ausência de lesão foram encontrados tanto no tratamento como no controle (figura 20).



FIGURA 20 - EFEITO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO ISOLADO LGMF1254 SOBRE FRUTOS ORIUNDOS DE REGIÕES COM ALTA INCIDÊNCIA DA DOENÇA MPC APÓS 21 DIAS

Nota: **A** - tratamento; **B** - grupo controle.

6 DISCUSSÃO

Estudos com microrganismos endofíticos, especialmente fungos, têm aumentado consideravelmente. O número de publicações relacionadas a estes microrganismos é cada vez maior. Isso em parte, porque o isolamento é um processo relativamente simples e a exploração dos benefícios que podem advir de tais estudos são bem vindos e podem sanar alguma carência da humanidade, seja na área agrônômica, farmacêutica ou ecológica.

A análise mediante cultura pareada demonstrou ser interessante quando objetiva-se a busca por antagonismos com um número elevado de isolados. Embora o teste possa inferir resultados falso-positivos, nenhum isolado promissor é

descartado das análises. Seguente ao teste de cultura pareada, a análise dos isolados produtores de metabólitos voláteis discrimina se a inibição evidenciada no primeiro teste é de natureza volátil ou pela difusão dos metabólitos no meio de cultura. Nos casos em que o crescimento do endofítico é rápido e se sobrepõe ao confrontante, impedindo a análise, o teste de metabólitos difusíveis pode sanar tais dúvidas. Os isolados utilizados no experimento são provenientes de pomares que receberam tratamento com agroquímicos, portanto, os isolados podem apresentar resistência aos fungicidas e a comunidade pode ter sido pré-selecionada. Desta forma os isolados desta origem podem ser interessantes em experimentos baseados na reintrodução do endofítico na planta, uma vez que testes utilizando organismos selvagens podem ser comprometidos pela alta susceptibilidade do fungo aos fungicidas.

A identificação molecular permitiu inferir apenas o gênero dos isolados. Muitos estudos têm tradicionalmente usado sequenciamento da região ITS para identificação de espécies devido à rápida evolução. Entretanto, muitos fungos não são representados no GenBank, e alguns registros são identificados erroneamente ou existe falta informações (LACAP; HYDE; LIEW, 2003). Desta forma, a análise filogenética de outras regiões genômicas deveria ser combinada com as de região ITS para melhorar a precisão da identificação taxonômica.

O fato de alguns dos isolados não apresentarem similaridades consistentes com o NCBI poderia estar relacionado ao banco de dados incompleto ou eventualmente tratar-se de espécie não descrita.

Notavelmente, o isolado LGMF1254 foi o mais promissor dentre os isolados testados quanto à inibição à *P. citricarpa*. Embora as sequências obtidas tenham sido relacionadas com *Fusarium polyphialidicum*, não foi possível identificar gênero e espécie por tratar-se de *Mycelia sterilia*.

A espécie *Fusarium polyphialidicum* foi isolada e descrita por Marasas et al. (1986) na África do Sul como fungo saprofítico em detritos vegetais. Na descrição dos autores, a espécie apresentou macro e microconídios em abundância, além da característica marcante da presença de células conidiogênicas com muitas fiálides.

O isolado LGMF1254 foi repicado em diversos meios de cultura e em nenhum substrato foram visualizados estruturas de reprodução. No entanto, Leslie (2006) descreve que alguns fungos são propensos à degeneração quando isolados e mantidos em meios ricos em carboidratos. Esta alteração é particularmente bem

conhecida para espécies de *Fusarium*. Os principais tipos de mutantes produzidos são classificados como pionnotal e micelial. O tipo pionnotal resulta em uma colônia plana e pegajosa com ausência do micélio aéreo, mas produz numerosos macroconídios. O mutante micelial é estéril e a colônia apresenta geralmente micélio de coloração branca. Embora a linhagem isolada de citros seja condizente com estas características, a incongruência das estruturas morfológicas e de reprodução não permite afirmar que o isolado LGMF1254 seja pertencente ao gênero *Fusarium*, sendo necessário, portanto, a realização de novos sequenciamentos para correta identificação do fungo.

A letalidade evidenciada no teste de formação de picnídios em comparação com os testes em frutos indica que o composto tóxico à *Phyllosticta* é produzido em pequenas quantidades. No teste de inibição de picnídios em folhas, onde o volume cedido para o desenvolvimento dos fungos é restrito, o efeito dos compostos voláteis resultaram na inibição total do desenvolvimento. Além da inibição, os fragmentos miceliais utilizados no teste de sobrevivência após o tratamento tornaram 96% dos fragmentos incapazes de se desenvolver, indicando que os voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254 não apenas inibem o desenvolvimento como também possui ação biocida ao patógeno.

No teste em frutos, o volume interno dos recipientes fornecido para o desenvolvimento dos fungos foi maior, o que diluiria a concentração dos compostos produzidos e resultaria na ausência de inibição no teste com frutos de pomares com alto índice da doença, ou pequena diminuição no tamanho das lesões, ocorrido no teste com lesões induzidas. Uma vez que no teste de otimização do meio de cultura, a inibição foi maior com o passar dos dias, supõe-se, que a concentração dos voláteis tenha aumentado e, portanto demonstrado este efeito.

No teste com frutos de pomar com alta incidência da MPC, o fungo encontrava-se protegido dos efeitos dos voláteis, portanto pode ser o motivo do resultado encontrado.

O isolado 45, identificado como *Phanerochaete* sp apresentou inibição considerável no teste de metabólitos não voláteis (60%). Este fungo é considerado saprófito, apresenta um grande potencial biotecnológico e é intensamente estudado em virtude de sua capacidade de degradar a lignina (TIEN; KIRK, 1984) diversos corantes têxteis (CRIPPS *et al.*, 1990) e poluentes persistentes (REDDY *et al.*, 1998).

O tratamento pós-colheita para os citros é voltado às podridões, principalmente o bolor verde e bolor azul, causados por *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* respectivamente, e é baseado na lavagem dos frutos com desinfetantes, seguido por aplicação de cera e fungicidas (FISCHER *et al.* 2007).

O tratamento da MPC com fungicidas em campo interfere no índice de infecções quiescentes, entretanto, a aplicação de fungicidas após a colheita geralmente não apresenta redução no aparecimento de lesões (AGOSTINI *et al.*, 2006).

A identificação dos compostos voláteis produzidos pelo LGMF1254 e a posterior síntese dos componentes pode mimetizar os efeitos dos voláteis produzidos pelo fungo na inibição de *Phyllosticta* e preencher esta lacuna principalmente para o comércio *in natura*.

Atualmente a Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa é o método mais comumente utilizado para a identificação de voláteis. O surgimento de novos métodos, como PTR-MS (Proton Transfer Reaction - Mass Spectrometry), que possibilita consultas online, e outras técnicas como Time-of-flight - Mass Spectrometry (TOF-MS) podem ser utilizadas em conjunto para a obtenção de uma maior resolução e identificação da totalidade dos compostos voláteis de uma amostra (INSAM; SEEWALD, 2010).

Apesar do transporte internacional de frutas cítricas ser realizado em condições que garante a seguridade e visam impedir o desenvolvimento do fungo, pela redução na temperatura e pela ausência de luz, a utilização dos compostos poderia, futuramente ser uma alternativa aos gastos para manter tais condições, tornando menos oneroso o transporte.

Testes futuros poderiam ainda analisar os efeitos voláteis sobre os principais patógenos pós-colheita dos citros *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Geotrichum candidum*.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste trabalho foi possível concluir que:

- Fungos endofíticos presentes em citros apresentam potencial como agentes produtores de substâncias antifúngicas;
- Os endofíticos identificados como *Phanerochaete* sp, *Nigrospora* sp, *Neofusicocum* sp, *Colletotrichum* sp e *Bionectria* sp inibiram o crescimento micelial de *P. citricarpa* mediante a produção de compostos difusíveis no meio de cultura, ao passo que o endofítico LGMF1254 reduziu o crescimento micelial de *P. citricarpa* devido a produção de compostos voláteis;
- O composto volátil produzido pelo isolado LGMF1254 foi capaz de reduzir o tamanho das lesões em frutos inoculados artificialmente e inibir completamente a formação de picnídios em folhas nos ensaios realizados;
- O composto volátil foi produzido independentemente do meio de cultura utilizado, sendo encontrados menores valores inibitórios no teste realizado com meio citros.
- Os resultados obtidos permitiram identificar possibilidades para o controle da Mancha Preta dos Citros, considerada hoje a pior enfermidade cítrica de origem fúngica, sem o uso de agrotóxicos.

8 REFERÊNCIAS

AGOSTINI, J. P.; PERES, N. A.; MACKENZIE, S. J.; ADASKAVEG, J. E.; TIMMER, L. W. Effect of Fungicides and Storage Conditions on Postharvest Development of Citrus Black Spot and Survival of *Guignardia citricarpa* in Fruit Tissues. **Plant Disease**, v. 90, n. 11, p. 1419-1424, 2006.

ALIA, H.; SUMMERELL, B. A.; BURGESSA, L. W. An evaluation of three media for the isolation of *Fusarium*, *Alternaria* and other fungi from sorghum grain. **Australasian Plant Pathology**, n. 1980, 2006.

ALTSCHUL, FS; MADDEN, LT; SCHÄFFER, AA; ZHANG, J; ZHANG, Z; MILLER, W; LIPMAN DJ "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", **Nucleic Acids Research**. 25:3389-3402. 1997.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVAL, P.T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Escola superior de Agricultura "Luis Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ASSOCITROS: <http://goo.gl/VAHmZC>. Data de acesso: 18/02/2012.

AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista Agrícola**, Piracicaba, v.15, p.468-475, 1940.

AZEVEDO J.L. **Fungos – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª. Edição. Caxias do Sul: Educs, 2010.

AZEVEDO, J.L. **Genética de Microrganismos**. 2ª. Edição. Goiânia: editora UFG, 2008.

AZEVEDO, J. L. ; ARAUJO, W. L. . Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH S.K.. (Org.). **Fungi: Multifaceted Microbes**. 01 ed. New Dehli And Boca Raton: Anamaya Publ. And Crc Press, v. 01, p. 189-207, 2006.

AZEVEDO, J. L. e COSTA, S. O. P. **Exercícios Práticos de Genética**. São Paulo: Companhia Editorial Nacional, EDUSP, 1973.

BACKMAN, P.A.; SIKORA, R.A. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**. Amsterdam. v 46, p.1-3. 2008.

BALDASSARI, R.B., WICKERT, E; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. **European Journal of Plant Pathology**, 120,103-110. 2008.

BAKIK, B.; TAYUNG, K.; JAGADEV, P. Molecular phylogeny and RNA secondary structure of *Fusarium* species with different lifestyles. **Plant Pathology & Quarantine**, n. 2002, p. 205-219, 2011.

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th ed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 1998. 218 p.

BERNARDO, E.R.A.; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Tropical Plant Pathology**, vol. 35, p. 37-42, 2010.

BONJORNO JR, GIOVANNI, JR. **Matemática fundamental**: uma nova abordagem - volume único . São Paulo: FTD, 2002.

BRENT, K J AND HOLLOWAY, D.W. **Fungicide resistance**: The assessment of risk. FRAC Monograph N° 2, second revised edition, FRAC, Bristol, UK. Pág 13-14. 52p, 2007.

BRENTU, F. C.; ODURO, K. A.; OFFEI, S. K. et al. Crop loss, aetiology, and epidemiology of citrus black spot in Ghana. **European Journal of Plant Pathology**, 2012.

CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklym, v.69, p. 2-9, 1988.

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

CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDIP, I.; KUMAR,B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, p. 75-81, 2005.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1114-1118, 1990.

DAVIES, F.S., ALBRIGO, L.G. Citrus. In: Atherton, J., Rees, A. (Eds.), **Crop Production Science in Horticulture**, vol. 2. Wallingford, UK : CAB International, 1994.

EZRA,D.; HESS W.M.; STROBEL, G.A. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. **Microbiology** 150, 4023–4031, 2004.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971.

FEICHTENBERGER, E. Mancha preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.17, n.1, p.93-107, 1996.

FIALHO, M. B., TOFFANO, L., PEDROSO, M. P., AUGUSTO, F., & PASCHOLATI, S. F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26, 925-932, 2010.

FISCHER, I. H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Caracterização dos Danos Pós-Colheita em Citros Procedentes de “ Packinghouse .” **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, 2007.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, C.R. Ocorrência e controle da pinta-preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado do Amazonas. **Comunicado técnico Embrapa** nº22. Manaus, AM. Abril 2004.

GERRITS VAN DEN ENDE AHG, HOOG GS DE. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology** 43:151– 162, 1999.

GOES, A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, vol.28, no. 1, p. 09-13. 2002.

GOES, A. Etiologia, aspectos epidemiológicos e controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta do citros. 100 p. **Relatório técnico**. 2005.

GOMES-FIGUEIREDO J, PIMENTEL IC, VICENTE VA, PIE MR, KAVA-CORDEIRO V, GALLI-TERASAWA L, PEREIRA JO, DE SOUZA AQ, GLIENKE C. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, 53(10), 1123-1132, 2007.

GOULIN, E.H; FIGUEIREDO, J.A.G; TORQUES, A; SENKIV; C, SILVA JR., G. J; KAVA-CORDEIRO, V; GLIENKE, C. Desenvolvimento de sistema de indução de sintomas de Mancha Preta dos Citros em frutos destacados. **Tropical Plant Pathology** 36 (Suplemento), p 748, 2011.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2011.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 2001, p. 9–18, 2004.

HERBERT, J.A. ; GRECH, N.M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to Benomyl in South Africa. **Plant disease**. p 1007. November, 1985.

HOEKSTRA, E.S.; APTROOT, A. **CBS Course of Mycology**, 4th edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn/Delft, the Netherlands, 1988.

HYDE, K.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163–173, 2008.

INSAM, H.; SEEWALD, M. S. A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 3, p. 199-213, 2010.

KERN, M.E, BLEVINS, KS. **Micologia médica: texto & atlas**. 2.ed. São Paulo: Premier, 1999.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp. the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**. v.73, p.249-92, 1948.

KIMATI, H, BERGAMIN FILHO A, AMORIM L.. Manual de Fitopatologia. 4ª.ed. São Paulo, SP, Agronômica Ceres, v. 2. **Doenças das Plantas Cultivadas**. p. 261-263, 2005.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease** 65: 945-950, 1981.

KUPPER, K.; MORETTO, C.; CORRÊA, E.; BETTIOL, W.; GOES, A. D. Control of *Guignardia citricarpa* by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 33, p. 1111-1118, 2011.

KURTZMAN, C.P; FELL, J.W. **The Yeasts - A Taxonomic Study**. 4º edição. Amsterdam, Elsevier Science, 1998. P 83

LACAP DC, HYDE KD, LIEW EC. An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Divers** 2003;12:53-66.

LEMON, N.; McNALLY, A. United States Department of Agriculture Confirms New Citrus Disease in Florida. Disponível em: <http://goo.gl/bXFJvV>. Data de acesso: 24 de agosto de 2010

LESLIE, J. F., AND SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Lab Manual**. Blackwell, Ames, IA, 2006.

LI, W.; ZHOU, J.; GUO, S. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. **Fungal Diversity**, p. 69-80, 2007.

LIN, X.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SU, W.; QIAN, X. Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity, identification and diversity of its polyketide synthase gene. **Fungal Diversity**, n. 1994, p. 1-13, 2010.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 67-73, 2000.

MACCHERONI W. Jr, ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. Em: : AZEVEDO J.L. **Fungos – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª. Edição. Caxias do Sul: Educs, 2010.

MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; WYK, P. S. V. *Fusarium polyphialidicum*, a New Species from South Africa. **Mycologia**, v. 78, n. 4, p. 678-682, 1986.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.369-409, 1993.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, v. 55, n.1, p.1-7, 1998.

MERCIER, J.; JIMENEZ, J. I. Control of decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology** 31, 1–8, 2004.

MISAGHI, I. J. ; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, 80: 808-811, 1990.

MITCHELL, A. M., STROBEL, G. A, MOORE, E., ROBISON, R., & SEARS, J. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology** 156 (Pt 1), 270-7, 2010.

NIEMEYER, H. Hydroxamic Acids Derived from 2-Hydroxy-2 H-1, 4-Benzoxazin-3 (4 H)-one: Key Defense Chemicals of Cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1677-1696, 2009.

NUNES, W. M. C.; CROCE FILHO, J.; SEVERINO, J. J.; ZANUTTO, C. A.; TESSMANN, D. J.; MAFACIOLI, R.; CORAZZA-NUNES, M. J.; VIDA, J. B. Ocorrência de pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, em tangerinas 'Montenegrina' no sul do Paraná. **Summa Phytopathologica**,v. 32, n. 3, p. 295, 2006.

ONYIKE, N. B. N.; NELSON, P. E. The distribution of *Fusarium* species in soils planted to millet and sorghum in Lesotho, Nigeria and Zimbabwe. **Mycopathologia**, v. 121, n. 2, p. 105–114, 1993.

PAL KK, MCSPADDEN GARDENER B. Biological Control of Plant Pathogens. **Plant Health Instruction**. 2006 doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117–02.

PEIXOTO-NETO P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência; Desenvolvimento** nº 29. p. 62-75, 2002.

PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**. 11p, 2011.

POSSIEDE, Y. M., GABARDO, J., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L. V., AZEVEDO, J. L., & GLIENKE, C.. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40(2), 308-313, 2009.

REDDY, G. V. B.; GELPKE, M. D. S.; GOLD, M. H.; GOLD, M. H. Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5159-5164, 1998.

REEDER, R.; KELLY, P.L.; HARLING R. First confirmed report of citrus black spot caused by *Guignardia citricarpa* on sweet oranges (*Citrus sinensis*) in Uganda. **Plant Pathology**. v 58, p.399. 2009.

RIKER, A. J., AND RIKER, R. S. **Introduction to Research on Plant Diseases**. John Swift, New York, 1936

ROBBS, C. F. A mancha preta dos fungos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.75-86, 1990.

RODRIGUEZ, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42: 323-327, 2007.

RUBINI, M. R., POMELLA, A. W. V., MAKI, C. S., ARAÚJO, W. L., SANTOS, D. R. DOS, AZEVEDO, J. L., & SILVA-RIBEIRO, R. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom. **International Journal of Biological Sciences**, 1, 24-33. (2005).

SANTOS FILHO, H.P; MAGALHÃES A.F.J; COELHO, Y.S. Citros: o produtor pergunta a Embrapa responde. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. p. 124-127, 2005.

SAUNDERS, M. Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. **New Phytologist**, p. 229-238, 2009.

SCHUTTE, C.G. Application of Azoxystrobin for Control of Benomyl-Resistant *Guignardia citricarpa* on 'Valencia' Oranges in South Africa. **Plant Disease** . Vol. 87 No. 7. p 784-788. 2003.

SIEBER, T. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 75-89, 2007.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; GOES, A.D.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha Preta Dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.30, n.1-2, p.45-64, 2009.

SPOSITO, M. B. Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. **Tese de doutorado**, 112 p. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

STINSON, A. M.; ZIDACK, N. K.; STROBEL, G. A.; JACOBSEN, B. J. Mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* for Control of Seedling Diseases of Sugar Beet and Verticillium Wilt of Eggplant. **Plant Disease**, n. 27, p. 1349-1354, 2003.

STRINGARI, D. **Sistemática e diversidade genética de isolados de *Guignardia Spp.* e *Phyllosticta Sp.* nos estados do Paraná e São Paulo.** 209 p. Tese de doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

STROBEL, G A; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**. v.147, n. 11, p. 2943-50, 2001.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 6, p. 535-44, 2003.

STROBEL, G., ; DAISY, B.. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67(4), 491, 2003.

STROBEL, GA. Microbial gifts from rain forests. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 24, 14-20, 2002.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 9-19, 2009.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M.; KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739, 2011.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-59, 2001.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 8, p. 2280-4, 1984.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Plagas y enfermedades de los cítricos**. Madrid: Mundi-Prensa. p. 23-25, 2002.

TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, A. S.; WINDHAM, M.T. **Plant Pathology: concepts and laboratory exercises**. Boca Raton London New York Washington, D.C :CRC Press, 2004.

VAN DER AA, H.A. Studies *Phyllosticta* 1. **A Studies in Mycology**, v.5, p.1-110, 1973.

VANETTEN, H. D.; MATTHEWS, D. E.; MATTHEWS, P. S. Phytoalexin Detoxification: Importance For Pathogenicity And Practical Implications. **Annual Review of Phytopathology**, v. 27, p. 143-164, 1989.

WANG, Y.; DAI, C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 207-215, 2010.

WATANABE, T. **Soil and Seed Fungi**. 2. ed. Flórida: CRC Press, 2002.

WILCOX D.; DOVE B.; MCDAVID D.; GREER D.UTHSCSA. Image Tool. University of Texas. Health Science Centre, San Antonio. 2002.

WORAPONG J.; STROBEL G.A.; FORD EJ, LI J.Y.; BAIRD G.; HESS, WM. *Muscodor albus* gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon** 79:67–79, 2001.

ZIKMUNDOVA, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; WERNER, C.; M. HESSE. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hydroxy-1, 4-benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4863-4870, 2002.

9 - ARTIGO : Fungo endofítico de citros com potencial para o controle da Mancha Preta Dos Citros

Plant Pathology**Impact factor: 2.237**

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2010: 12/74 (Agronomy); 51/187 (Plant Sciences)

Online ISSN: 1365-3059

Qualis (CAPES): Plant Pathology (Online) B1 CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I (2012)

Fungo endofítico de citros com potencial para o controle da Mancha Preta Dos Citros

L. F. Jung*; R. Schu; E. H. Goulin; L. V. Galli-Terasawa; C. Glienke; V. Kava-Cordeiro

Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná- UFPR, Centro Politécnico

CEP 81531-900, Curitiba, PR

*E-mail para correspondência: fernandojung@hotmail.com

RESUMO

Entre as doenças que acometem a produção de citros destaca-se a Mancha Preta dos Citros causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa. Restrições fitossanitárias impostas pelos países importadores acarretam a rejeição de cargas inteiras de frutos com sintomas da doença. Fungos endofíticos isolados de citros foram testados quanto ao antagonismo a *P. citricarpa* mediante ensaios de cultura pareada, avaliação da produção de compostos voláteis e de compostos não voláteis. A análise foi baseada na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno em condições controladas. O endofítico inibiu o crescimento micelial de *P. citricarpa* em 60% mediante a produção de compostos voláteis e inibiu em 100% a formação de picnídios em folhas de citros. Em testes sob condições controladas os voláteis não inibiram o aparecimento de lesões em frutos oriundos de regiões com alta incidência da doença, entretanto, em testes com lesões induzidas houve redução de 26% no diâmetro médio das lesões da MPC, quando comparado ao controle. Tal resultado é de grande importância uma vez que a exposição de frutos pós-colheita a um composto volátil é de fácil operacionalização, especialmente em frutos destinados a exportação. Este é o primeiro relato de um composto volátil produzido por um fungo endofítico de citros com ação antagonista a *Phyllosticta citricarpa*.

Palavras chave: *Phyllosticta citricarpa*, antagonismo, Mancha Preta dos Citros, metabólitos voláteis.

INTRODUÇÃO

A Mancha Preta dos Citros (MPC) é uma fitopatologia ocasionada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa (1973), teleomorfo *Guignardia citricarpa* Kiely (1948). Este microrganismo provoca lesões em frutos cítricos afetando todas as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*), limões verdadeiros (*Citrus limon* e *Citrus*

limonia), pomelos (*Citrus maxima*) e algumas variedades de tangerina (*Citrus reticulata*), excluindo-se apenas variedades de laranja azeda (*Citrus aurantium*) e lima ácida “Tahiti” (*Citrus latifolia* Tanaka), (Kotzé 1981; Baldassari, Wickert, Goes, 2008).

Este fungo deteriora a casca do fruto e dependendo da intensidade da doença além de prejudicar a aparência, está diretamente relacionada à queda prematura dos frutos, reduzindo a produtividade e a qualidade, inviabilizando a comercialização (Sposito, 2003; Gasparotto; Pereira, 2004). Os sintomas geralmente surgem tarde e durante a temporada os frutos que não apresentam indícios da doença podem vir a desenvolver os sintomas no período pós-colheita. O surgimento das lesões é influenciado pelas condições de transporte ou armazenamento, temperaturas elevadas e a alta luminosidade durante este período favorecem o desenvolvimento dos sintomas (Agostini; *et al.* 2006).

A doença é considerada quarentenária A1 na União Europeia por não estar presente em seus países. Em virtude disso, tolerância em relação à importação de frutos que apresentem sintomas da doença é zero e cargas inteiras são recusadas.

O controle químico usualmente aplicado no campo é uma prática importante, reduzindo de maneira eficaz os danos quantitativos causados pela queda prematura de frutos sintomáticos. Entretanto, não é capaz de reduzir a intensidade da doença para a produção de frutos in natura nas áreas com alta incidência (Sposito, 2003).

Problemas como o surgimento de isolados de *Phyllosticta citricarpa* resistentes aos agroquímicos, impactos negativos ao ambiente e restrições de ordem pública e econômica estimulam a busca de novas alternativas de controle de doenças, principalmente pela introdução de agentes de biocontrole e de produtos alternativos (Bernardo; Betiol, 2010).

Devido aos problemas de saúde e ambientais, muitos agentes sintéticos utilizados na agricultura foram e têm sido removidos do mercado, o que gera a necessidade de encontrar formas alternativas para o controle de pragas e patógenos (Strobel, 2003). Caso recente foi

evidenciado na utilização do fungicida Carbendazim, permitido no Brasil, Japão, Canadá e União Europeia, mas restringido nos Estados Unidos, os maiores importadores da produção brasileira. Segundo a *Food and Drug Administration*, o fungicida pode deixar resíduos acima do nível tolerável nos derivados cítricos, apesar disso, o uso nos EUA é autorizado na produção de maçãs (ASSOCITRUS, 2012).

Produtos resultantes do metabolismo secundário de endofíticos são intensamente estudados por apresentarem oportuna utilização na indústria, medicina e agricultura, e incluem alcalóides, benzopirranonas, flavonóides, ácidos fenólicos, quinonas, esteróides, terpenóides, tetralonas e xantonas (Tan; Zou, 2001). Algumas das diversas utilizações das substâncias produzidas por endofíticos são utilizadas como compostos anticancerígenos, antioxidantes e antimicrobianos (Pimentel et al., 2011).

A maioria dos microrganismos produz e secreta um ou mais compostos com atividade antibiótica, em alguns casos eficazes na supressão de fitopatógenos e doenças causadas por estes (Pal; Mcspadden, 2006). O objetivo deste trabalho foi testar a atividade antagônica de isolados de citros frente à *Phyllosticta citricarpa* e estabelecer possibilidades para o controle da Mancha Preta dos Citros.

MATERIAIS E MÉTODOS

A atividade antagônica dos isolados foi testada mediante teste de cultura pareada (Mariano, 1993). Os endofíticos foram confrontados em placas de Petri contra *Phyllosticta citricarpa* e o diâmetro da colônia do fitopatógeno foi mensurado após 14 dias. A porcentagem de inibição foi calculada conforme Edginton *et al.* (1971).

Os isolados com inibição superior a 50 % foram submetidos ao teste de metabólitos não voláteis (Gomes, 2008). A ação por metabólitos voláteis foi realizada utilizando placas de Petri com divisória. A análise foi realizada após 14 dias.

Os isolados com maior porcentagem de inibição frente à *P. citricarpa* foram identificados por sequenciamento da região ITS, utilizando os primers V9G e LS266 (Gerrits Van Den Ende; De Hoog, 1999).

Análise dos voláteis produzidos pelo endofítico LGMF1254 no desenvolvimento de picnídios em folhas de citros

A atividade inibitória exercida por compostos voláteis foi testada quanto a influencia na produção de picnídios em folhas de citros. Para tanto foi realizado um ensaio utilizando placas de Petri com divisória. Em um dos compartimentos foi vertido meio completo e inoculado um cilindro de micélio de 6 mm de diâmetro do endófito. No outro compartimento foi depositada uma camada de meio ágar água e sobre este, cilindros de folha de citros com 10 mm de diâmetro. Nas extremidades das folhas foi inoculado fragmentos miceliais de *Phyllosticta citricarpa*. A análise foi realizada mediante contagem dos picnídios formados sobre os fragmentos de folhas, em comparação com o grupo controle, onde não houve a inoculação do endofítico. Como controle negativo foi aplicado 10 µL de solução de Carbendazin em concentração de 1,0 mg/mL sobre os cilindros de folhas de citros e posteriormente efetuou-se o inóculo de micélio de *P. citricarpa* nas extremidades foliares.

A contagem foi realizada 14 dias após o início do tratamento e os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por teste LSD a 5% de probabilidade. Para conferir a viabilidade do inóculo de *Phyllosticta citricarpa* após o tratamento, fragmentos de 2 mm utilizados no teste de formação de picnídios (os mesmos que foram colocados nas bordas das folhas) foram transferidos para novas placas contendo meio de cultura BDA. O desenvolvimento foi comparado com a inoculação de cubos de mesma medida e de mesma origem utilizada para o teste de picnídios. O ensaio foi realizado inoculando 6 fragmentos por placa, com 5 repetições. Os dados foram analisados pelo teste binomial de Fisher.

Efeito dos voláteis no desenvolvimento de lesões induzidas em frutos

Frutos cultivados sem o uso de fungicidas, cedidos pelo Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura) foram externamente desinfetados e a inoculação de micélio em frutos foi realizada conforme Goulin et al. (2011). Em cada fruto foram marcados dez círculos na linha transversal em cinco destes foi introduzido com auxílio de agulha, micélio de *P. citricarpa*, e nos círculos restantes, apenas a injúria provocada pela agulha foi realizada. Recipientes plásticos com tampa foram esterilizados mediante limpeza interna com solução de hipoclorito e álcool 70% e posteriormente foram submetidos à luz ultravioleta por 30 minutos. No interior destes frascos foi vertida uma camada de meio BDA com adição de ácido nalidíxico (100 µg/mL) e cilindros de micélio do endofítico foram inoculados na extremidade dos frascos. O fruto infectado foi depositado no interior dos potes sobre a base de placas de Petri, sem contato com o meio de cultura e o endofítico. Os potes foram tampados e mantidos em câmara de germinação a 26 graus sob luz constante durante 30 dias. Após esse período as lesões foram foto documentadas e mensuradas com aumento de 16 vezes. O experimento foi realizado com 10 repetições.

Análise dos voláteis na formação de lesões em frutos propensos à doença

Os voláteis produzidos pelo endofítico foram testados quanto à inibição dos sintomas em frutos oriundos de pomares com alto índice da doença MPC. Para tanto, foram utilizadas laranjas de pomares da cidade de Matão – São Paulo. Os frutos foram desinfetados externamente e depositados em potes plásticos transparentes. Em cada pote foram colocadas três laranjas e três placas de Petri com inóculo do LGMF1254. Estas placas foram deixadas abertas, mas sem contato com os frutos. Os potes foram vedados e mantidos em câmara de germinação a 26 graus sob luz constante. Para o grupo controle procedeu-se da mesma forma, porém, sem a deposição das placas com LGMF1254. O experimento foi realizado com 5

repetições. Após 21 dias, o número de lesões foi contado e os valores obtidos analisados através do teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.

Influência do meio de cultura na produção do composto volátil

Foram testados 7 meios de cultura visando identificar a influência na produção do composto volátil. Para tanto, foram utilizadas placas de Petri com divisória. Em um dos compartimentos foi vertido 10 mL de meio completo e inoculado um cilindro de 6 mm de diâmetro de *Phyllosticta*. No outro compartimento verteu-se 10 mL do meio a ser testado. Foram utilizados o Meio Citros (Stringari, 2009), Ágar Batata Dextrose (Riker; Riker, 1936), Meio Completo (Azevedo; Costa, 1973), Meio Ágar-Aveia (Hoekstra; Aptroot, 1988), Meio Milho, Meio Arroz (Kurtzman; Fell, 1998) e Ágar Extrato de Malte (HIMEDIA®). Após três dias, confirmada a viabilidade do inóculo, foi depositado um cilindro de micélio com 6 mm do endofítico. As placas foram vedadas com plástico PVC e depositadas em BOD a 28 graus Celsius. A determinação do meio de cultura mais promissor na produção do composto volátil foi realizada mediante a porcentagem de inibição do diâmetro da colônia do fitopatógeno, aos 7, 10, 14 e 21 dias de tratamento. O experimento foi realizado com sete repetições para cada meio de cultura. O grupo controle consistiu da inoculação do cilindro de *Phyllosticta* em meio completo, sem a presença do endofítico.

A análise estatística foi realizada mediante o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação LSD a 5%.

RESULTADOS

Os isolados com valores mais expressivos de inibição no teste de cultura pareada (valores entre parênteses) foram: Isolado LGMF1254 (69,9%), *Phanerochaete* sp (60,3%), *Neofusicoum* sp (54.7%) *Nigrospora* sp (53.4%) *Colletotrichum* sp (50.2%), *Bionectria* sp

(50.2%). No teste de metabólitos voláteis, o maior valor de inibição encontrado foi também para o isolado LGMF1254 (60.3%), evidenciando que a inibição no teste de cultura pareada seja devido à produção de voláteis. No teste de metabólitos não voláteis, o isolado LGMF1254 teve resultados pouco expressivos (14.2%), portanto, os resultados antagônicos tornam este fungo potencial para o estudo de compostos orgânicos voláteis.

Teste de formação de picnídios em folhas

Não foi observada a presença de picnídios sobre a superfície foliar em nenhuma das placas tratamento. No grupo controle negativo (carbendazin) houve o desenvolvimento de dois picnídios, porém, o valor não diferiu estatisticamente do tratamento com o volátil (p-value = 0.000002). Na figura 01 e 02 é possível observar que os fragmentos miceliais de *P. citricarpa* não desenvolveram quando inoculados em conjunto com o isolado LGMF1254. Este resultado foi encontrado em todas as placas que receberam tratamento. Após o repique dos fragmentos de *P. citricarpa* retirados do teste anterior foi verificado que apenas um dos fragmentos (3,333%) continuou viável. Os demais fragmentos não se desenvolveram (figura 03). O tratamento foi eficiente em 96,666 % (p < 0,0001) dos fragmentos, indicando que o volátil possui ação não apenas fungistática, mas também fungicida ao patógeno.

Inibição de lesões induzidas em frutos mediante exposição a compostos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254

Os compostos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254, embora não tenham impedido o aparecimento das lesões nos frutos inoculados com o fitopatógeno, reduziu o diâmetro médio destas em 26,75%. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado seguido pelo teste t. Pelos resultados foi possível demonstrar haver diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade entre os frutos tratados e o controle. Foi verificado se a

concentração do volátil estaria influenciando na ação sobre as lesões, portanto o volume dos potes foi mensurado pela seguinte fórmula: $V = (\pi \cdot h/3) \cdot (R^2 + Rr + r^2)$. Deste valor foi descontado o volume do meio de cultura utilizado, ($V = \pi \cdot r^2 \cdot h$), e o volume dos frutos ($V = 4/3 \pi \cdot r^2$), onde “R” corresponde ao raio maior e “r” ao raio menor (Bonjorno; Giovanni *et al.* 2002). O volume fornecido para o desenvolvimento do fungo não pôde ser relacionado ao diâmetro médio das lesões.

Efeito dos voláteis na inibição de sintomas em frutos de regiões com alta incidência da doença

O composto volátil produzido pelo LGMF1254 não inibiu o aparecimento de lesões nos frutos oriundos de região com alta incidência da doença. Portanto, analisaram-se os dados mediante o número de lesões evidenciadas em cada fruto. O número de lesões nos frutos expostos aos compostos voláteis do LGMF1254 não diferiu do grupo controle no teste de Mann-Whitney. Frutos com lesões severas e com ausência de lesão foram encontrados tanto no tratamento como no controle.

Influência do meio de cultura na produção do composto volátil

A inibição diferencial de *P. citricarpa* perante os tratamentos foi considerada como resultado da influência do meio de cultura na produção dos voláteis pelo isolado LGMF1254. Em todos os meios de cultura testados, o LGMF1254 foi capaz de produzir os voláteis resultando na diminuição do diâmetro de *P. citricarpa*. As diferenças na porcentagem de inibição encontradas entre os tratamentos demonstram diminuição no decorrer dos dias. Ao 21º dia, com exceção do meio citros, todos igualmente permitiram a produção dos voláteis inibindo o diâmetro do crescimento micelial do fitopatógeno, com redução de 71.9% a 81.10% (LSD 5%).

DISCUSSÃO

O número de publicações relacionadas a microrganismos endofíticos é cada vez maior. Isso em parte, porque o isolamento é um processo relativamente simples e a peculiaridade de seu desenvolvimento dentro de plantas fez com que produzissem metabólitos que podem ser úteis na área agrônômica, farmacêutica e ecológica.

A prospecção de uma coleção de fungos endofíticos obtidos de citros mediante cultura pareada demonstrou ser interessante quando objetiva-se a busca por antagonismos com um número elevado de isolados. Embora o teste possa inferir resultados falso-positivos, nenhum isolado promissor é descartado das análises. Seguente ao teste de cultura pareada, a análise dos isolados produtores de metabólitos voláteis discrimina se a inibição evidenciada no primeiro teste é de natureza volátil ou pela difusão dos metabólitos no meio de cultura. Nos casos em que o crescimento do endofítico foi rápido e se sobrepôs ao confrontante, impedindo a análise, o teste de metabólitos difusíveis foi elucidativo. Os isolados utilizados no experimento são provenientes de pomares que receberam tratamento com agroquímicos, portanto foram pré-selecionados por apresentarem algum grau de resistência a fungicidas. Neste aspecto, isto torna-se uma vantagem pois pode-se considerar a reintrodução do endofítico na planta, uma vez que testes utilizando organismos selvagens podem ser comprometidos pela alta susceptibilidade do fungo aos fungicidas. Notavelmente, o LGMF1254 foi o mais promissor dentre os isolados testados quanto à inibição de *P. citricarpa*. Este é o primeiro relato de um fungo endofítico com ação antagonista a *P. citricarpa* mediante a produção de metabólitos voláteis.

O isolado LGMF1254 foi testado em diversos meios de cultura e não foram visualizados macroconídios, microconídios ou clamidósporos. A produção pelo LGMF1254 de um composto que inibisse possíveis competidores *in vivo* poderia lhe conferir alguma vantagem na microbiota da planta. A letalidade evidenciada no teste de formação de picnídios

em comparação com os testes em frutos indica que o composto tóxico à *Phyllosticta* é produzido em pequenas quantidades. No teste de inibição de picnídios em folhas, onde o volume cedido para o desenvolvimento dos fungos é restrito, os voláteis resultaram na inibição total do desenvolvimento. Além da inibição, os fragmentos miceliais utilizados no teste de sobrevivência após o tratamento tornaram 96% dos fragmentos incapazes de se desenvolver, indicando que os efeitos dos voláteis produzidos pelo LGMF1254 não apenas inibem o desenvolvimento como também possui ação biocida ao patógeno. No teste em frutos o volume interno dos recipientes, fornecido para o desenvolvimento dos fungos foi maior, o que diminuiu a concentração dos compostos produzidos e pode ter resultado na ausência de inibição das lesões em frutos de regiões com alta incidência da MPC, ou pequena diminuição no tamanho das mesmas, ocorrido no teste com lesões induzidas. Uma vez que no teste de otimização do meio de cultura, a inibição foi maior com o passar dos dias, supõe-se, que a concentração dos voláteis tenha aumentado e, portanto demonstrado este efeito. No teste com frutos de pomar com alta incidência da MPC, o fungo encontrava-se protegido dos efeitos dos voláteis e, portanto pode ser o motivo do resultado encontrado. O tratamento pós-colheita para os citros é voltado às podridões, principalmente o bolor verde e bolor azul, causados por *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* respectivamente, e é baseado na lavagem dos frutos com desinfetantes, seguido por de aplicação de cera e fungicidas (Fischer *et al.* 2007).

O tratamento da MPC com fungicidas em campo interfere no índice de infecções quiescentes, entretanto, a aplicação de fungicidas após a colheita geralmente não apresenta redução no aparecimento de lesões (Agostini *et al.*, 2006).

A identificação dos compostos voláteis produzidos pelo isolado LGMF1254 e a posterior síntese destes componentes, pode mimetizar os efeitos dos voláteis produzidos pelo fungo vivo na inibição de *Phyllosticta* e preencher esta lacuna principalmente para o comércio *in natura*. Atualmente a Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa é o

método mais comumente utilizado para a identificação de voláteis. O surgimento de novos métodos, como PTR-MS, que possibilita consultas online, e outras técnicas como time-of-flight (TOF MS) podem ser utilizadas em conjunto para a obtenção de uma maior resolução e identificação da totalidade dos compostos voláteis de uma amostra (Insam; Seewald, 2010).

Apesar do transporte internacional de frutas cítricas ser realizado em condições que garante a seguridade e visam impedir o desenvolvimento de *Phyllosticta citricarpa*, pela redução na temperatura e pela ausência de luz, a utilização dos compostos poderia, futuramente ser uma alternativa aos gastos para manter tais condições, tornando menos oneroso o transporte. Testes futuros poderiam ainda analisar os efeitos voláteis sobre os principais patógenos pós-colheita dos citros *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Geotrichum candidum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPQ, Fundação Araucária e a Fundecitrus pelo suporte financeiro e ao projeto REUNI pela bolsa concedida a L.F.J. Os autores também são gratos a Ana Luíza Mattana e a Maicon André Wons Fernandes pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, J. P.; PERES, N. A.; MACKENZIE, S. J.; ADASKAVEG, J. E.; TIMMER, L. W. Effect of Fungicides and Storage Conditions on Postharvest Development of Citrus Black Spot and Survival of *Guignardia citricarpa* in Fruit Tissues. *Plant Disease*, v. 90, n. 11, p. 1419-1424, 2006.

ASSOCITROS: <http://goo.gl/q1gfOM>. Data de acesso: 18/02/2012.

AZEVEDO, J. L. e COSTA, S. O. P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo: Companhia Editorial Nacional, EDUSP, 1973

- BALDASSARI, R.B., WICKERT, E; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. *European Journal of Plant Pathology*, 120,103-110. 2008.
- BERNARDO, E.R.A; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. *Tropical Plant Pathology*, vol. 35, p. 37-42, 2010.
- BONJORNO JR, GIOVANNI, JR. Matemática fundamental: uma nova abordagem - volume único . São Paulo: FTD, 2002.
- EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971.
- FISCHER, I. H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Caracterização dos Danos Pós-Colheita em Citros Procedentes de “ Packinghouse .” *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, n. 4, 2007.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA,C.R. Ocorrência e controle da pinta-preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado do Amazonas. *Comunicado técnico Embrapa* n°22. Manaus, AM. Abril 2004.
- GERRITS VAN DEN ENDE AHG, HOOG GS DE. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology* 43:151– 162, 1999.
- GOMES, R.R.; *Phomopsis* spp. *Endófitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo Guignardia citricarpa*. 142 p. Dissertação de mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- GOULIN, E.H; FIGUEIREDO, J.A.G; TORQUES, A; SENKIV; C, SILVA JR., G. J; KAVA-CORDEIRO, V; GLIENKE, C. Desenvolvimento de sistema de indução de sintomas de Mancha Preta dos Citros em frutos destacados. *Tropical Plant Pathology* 36 (Suplemento), p 748, 2011.

HOEKSTRA, E.S.; APTROOT, A. *CBS Course of Mycology*, 4th edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn/Delft, the Netherlands, 1988.

INSAM, H.; SEEWALD, M. S. A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils*, v. 46, n. 3, p. 199-213, 2010.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp. the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*. v.73, p.249-92, 1948.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease* 65: 945-950, 1981.

KURTZMAN, C.P; FELL, J.W. *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 4° edição. Amsterdam, Elsevier Science, 1998. P 83.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revista Anual de Patologia de Plantas*, v.I, p.369-409, 1993.

PAL KK, MCSPADDEN GARDENER B. Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instruction*. 2006 doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

PIMENTEL, M. R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology Research International*. 11p, 2011.

RIKER, A. J., AND RIKER, R. S. *Introduction to Research on Plant Diseases*. John Swift, New York, 1936.

SPOSITO, M. B. *Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (Guignardia citricarpa) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros*. Tese de doutorado, 112 p. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

STRINGARI, D. *Sistemática e diversidade genética de isolados de Guignardia Spp. e Phyllosticta Sp. nos estados do Paraná e São Paulo*. 209 p. Tese de doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, v. 5, n. 6, p. 535-44, 2003.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v. 18, n. 4, p. 448-59, 2001.

VAN DER AA, H.A. Studies *Phyllosticta* 1. A *Studies in Mycology*, v.5, p.1-110, 1973

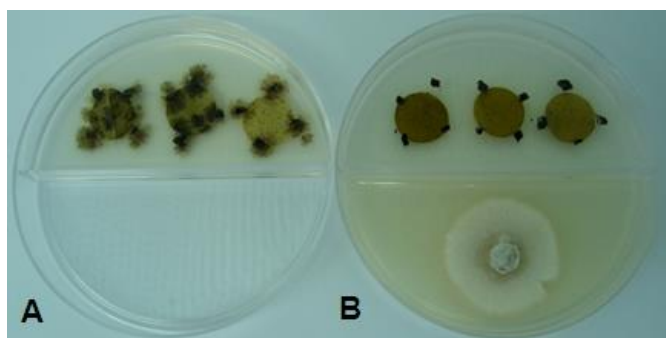


FIGURA 01: Efeito dos voláteis produzidos pelo LGMF1254 em folhas de citros inoculadas com *P. citricarpa*.

Nota: em A o desenvolvimento de *P. citricarpa* e a formação de picnídios; em B o tratamento mostrando a ausência do desenvolvimento do fitopatógeno.

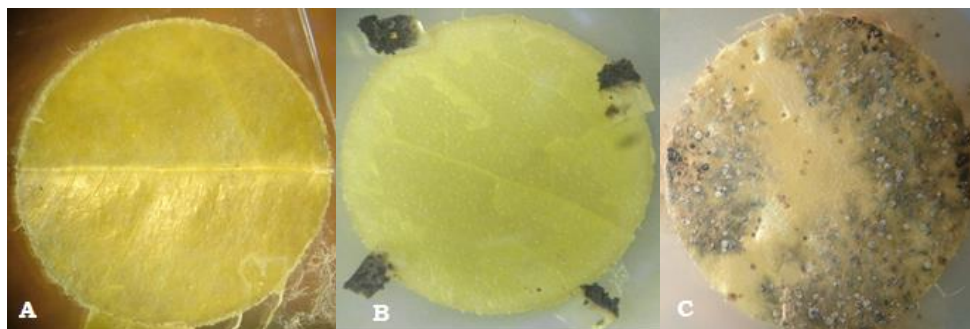


FIGURA 02 - Efeito dos voláteis produzidos pelo LGMF1254 no desenvolvimento de picnídios em folhas.

Nota: em A o controle negativo (com carbendazim); em B efeito dos voláteis do LGMF1254; e em C o controle positivo (sem tratamento).

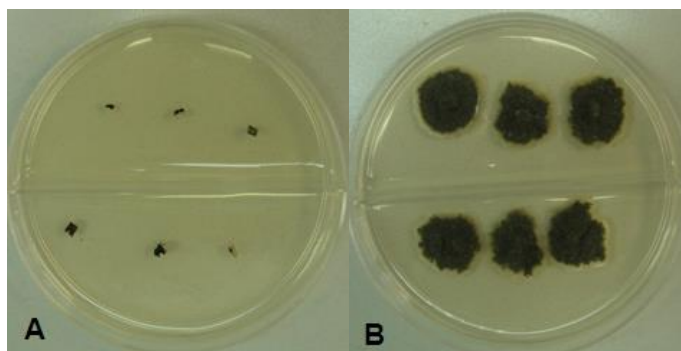


FIGURA 03 – desenvolvimento dos fragmentos retirados do teste de formação de picnídios após 14 dias.

Nota: em A os fragmentos submetidos ao tratamento; em B o controle de crescimento de *P. citricarpa*

APÊNDICE

APÊNDICE 01 - ANÁLISE ESTATÍSTICA - CULTURA PAREADA

Isolado	n	média	Variância	Desvio padrão
Controle +	4	26.125	2.72917	1.65202
1	3	21.3333	2.08333	1.44338
2	4	22.75	10.0833	3.17543
3	4	22.375	1.22917	1.10868
4	4	18.125	0.729167	0.853913
6	3	24.3333	12.3333	3.51188
7	3	12.1667	0.583333	0.763763
9	4	21.75	3.08333	1.75594
10	4	17.625	3.22917	1.79699
11	4	16.25	4.08333	2.02073
12	4	21.25	5.41667	2.32737
13	3	18.3333	9.33333	3.05505
14	3	11.8333	0.333333	0.57735
15	3	17.3333	1.33333	1.1547
16	4	18.75	1.08333	1.04083
17	3	17.8333	0.0833333	0.288675
18	4	15.5	1.66667	1.29099
19	4	18.5	2.0	1.41421
20	4	16.75	3.41667	1.84842
21	4	19.75	1.75	1.32288
22	3	18.8333	7.58333	2.75379
23	4	13.0	6.16667	2.48328
24	4	17.875	0.895833	0.946485
25	4	21.625	1.22917	1.10868
26	4	21.25	0.916667	0.957427
27	4	18.125	2.72917	1.65202
28	4	15.375	0.5625	0.75
29	4	17.5	1.16667	1.08012
30	4	16.75	0.0833333	0.288675
31	3	23.6667	2.58333	1.60728
32	4	19.0	3.16667	1.77951
33	4	16.75	0.75	0.866025
34	4	22.5	2.16667	1.47196
35	4	19.25	5.75	2.39792
36	4	25.5	3.16667	1.77951
37	4	23.75	0.416667	0.645497
38	4	17.625	5.72917	2.39357
39	3	23.0	9.25	3.04138
40	4	21.625	0.729167	0.853913
41	4	23.375	5.89583	2.42813
42	3	17.8333	6.08333	2.46644
43	3	23.8333	0.0833333	0.288675
44	4	14.125	4.22917	2.05649
45	4	10.375	1.0625	1.03078
46	3	22.6667	8.08333	2.84312
47	4	14.875	0.229167	0.478714
48	4	16.5	1.5	1.22474
49	3	15.8333	3.58333	1.89297
50	4	18.0	6.16667	2.48328
51	4	16.25	3.75	1.93649
52	4	26.25	2.25	1.5
53	4	16.625	0.5625	0.75
54	4	24.375	1.39583	1.18145
55	4	18.75	1.75	1.32288
56	4	22.625	0.5625	0.75
57	4	17.625	11.8958	3.44903
58	4	14.0	2.16667	1.47196
59	4	16.75	4.41667	2.10159
60	4	16.375	0.229167	0.478714
61	3	16.3333	0.583333	0.763763
62	3	20.5	9.25	3.04138
63	3	15.6667	1.08333	1.04083
64	4	16.625	0.0625	0.25
LGMF1254	4	7.875	2.0625	1.43614

Isolado	n	média	Variância	Desvio padrão
66	4	20.875	2.0625	1.43614
67	4	19.125	0.395833	0.629153
68	4	16.875	8.5625	2.92617
1068	3	18.8333	1.33333	1.1547
1075	3	13.0	0.0	0.0
Controle -	4	0.0	0.0	0.0
Total	261	18.3314	21.3272	4.61814

Variance Check

Cochran's C test: 0.0579256 P-Value = 0.632805
 Bartlett's test: 1.76452 P-Value = 0.0174357
 Hartley's test: 197.333
 Levene's test: 0.982718 P-Value = 0.522465

APÊNDICE 1.1 - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS PARA CULTURA PAREADA

Isolados	Sample Size	Average Rank
Controle +	4	253.125
1	3	191.333
2	4	211.75
3	4	209.0
4	4	129.75
6	3	227.333
7	3	19.6667
9	4	198.25
10	4	116.875
11	4	79.75
12	4	188.0
13	3	129.0
14	3	17.3333
15	3	106.333
16	4	144.0
17	3	121.333
18	4	60.0
19	4	135.375
20	4	92.75
21	4	163.875
22	3	137.333
23	4	33.5
24	4	123.0
25	4	196.75
26	4	190.5
27	4	125.875
28	4	53.75
29	4	111.25
30	4	90.0
31	3	227.167
32	4	146.5
33	4	88.5
34	4	211.25
35	4	149.625
36	4	247.375
37	4	230.75
38	4	108.75
39	3	218.167
40	4	196.875
41	4	220.625
42	3	121.0
43	3	232.667
44	4	40.75
45	4	11.125
46	3	213.0
47	4	43.5

Isolados	Sample Size	Average Rank
48	4	84.375
49	3	69.8333
50	4	117.5
51	4	80.875
52	4	253.25
53	4	85.125
54	4	237.75
55	4	143.125
56	4	212.25
57	4	110.375
58	4	35.25
59	4	92.75
60	4	78.0
61	3	78.0
62	3	170.667
63	3	61.8333
64	4	86.25
LGMF1254	4	6.75
66	4	184.625
67	4	154.625
68	4	95.625
1068	3	146.0
1075	3	24.0
Controle -	4	2.5

Test statistic = 219.746 P-Value = 0.0

APÊNDICE 1.2 – TESTE LSD PARA CULTURA PAREADA

Method: 95.0 percent LSD

Isolados	Count	Mean	Homogeneous Groups
Controle -	4	0.0	X
LGMF1254	4	7.875	X
45	4	10.375	X
14	3	11.8333	XX
7	3	12.1667	XX
23	4	13.0	XX
1075	3	13.0	XXX
58	4	14.0	XXXX
44	4	14.125	XXXXX
47	4	14.875	XXXXX
28	4	15.375	XXXXXX
18	4	15.5	XXXXXX
63	3	15.6667	XXXXXXX
49	3	15.8333	XXXXXXX
51	4	16.25	XXXXXXXX
11	4	16.25	XXXXXXXX
61	3	16.3333	XXXXXXXX
60	4	16.375	XXXXXXXX
48	4	16.5	XXXXXXXX
53	4	16.625	XXXXXXXX
64	4	16.625	XXXXXXXX
30	4	16.75	XXXXXXXX
33	4	16.75	XXXXXXXX
20	4	16.75	XXXXXXXX
59	4	16.75	XXXXXXXX
68	4	16.875	XXXXXXXX
15	3	17.3333	XXXXXXXXXX
29	4	17.5	XXXXXXXXXX
57	4	17.625	XXXXXXXXXX
38	4	17.625	XXXXXXXXXX
10	4	17.625	XXXXXXXXXX
42	3	17.8333	XXXXXXXXXX
17	3	17.8333	XXXXXXXXXX
24	4	17.875	XXXXXXXXXX
50	4	18.0	XXXXXXXXXX
27	4	18.125	XXXXXXXXXX
4	4	18.125	XXXXXXXXXX
13	3	18.3333	XXXXXXXXXX
19	4	18.5	XXXXXXXXXX
16	4	18.75	XXXXXXXXXX
55	4	18.75	XXXXXXXXXX
1068	3	18.8333	XXXXXXXXXX
22	3	18.8333	XXXXXXXXXX
32	4	19.0	XXXXXXXXXX
67	4	19.125	XXXXXXXXXX
35	4	19.25	XXXXXXXXXX
21	4	19.75	XXXXXXXXXX
62	3	20.5	XXXXXXXXXX
66	4	20.875	XXXXXXX
26	4	21.25	XXXXXX
12	4	21.25	XXXXXX
1	3	21.3333	XXXXXXX
25	4	21.625	XXXXXX
40	4	21.625	XXXXXX
9	4	21.75	XXXXXX
3	4	22.375	XXXXXX
34	4	22.5	XXXXXX
56	4	22.625	XXXXXX
46	3	22.6667	XXXXXX
2	4	22.75	XXXXXX
39	3	23.0	XXXXXXX
41	4	23.375	XXXXXX
31	3	23.6667	XXXXXXX
37	4	23.75	XXXXXX
43	3	23.8333	XXXXXXXX
6	3	24.3333	XXXXXX
54	4	24.375	XXXXXX
36	4	25.5	XXX
Controle +	4	26.125	XX
52	4	26.25	X

APÊNDICE 02 - TABELA DOS METABÓLITOS VOLÁTEIS 7 E 14 DIAS. VALORES EXPRESSOS EM PERCENTAGEM

Isolado	Inibição ao 7° dia (%)	Inibição no 15° dia (%)
1	9.68	29.79
2	8.60	9.18
3	10.39	32.37
4	3.23	22.71
6	4.66	3.38
9	4.66	10.47
10	9.14	19.81
11	-1.61	20.77
12	1.61	8.21
13	9.68	20.77
14	20.43	*
15	9.68	22.06
17	15.59	*
19	12.54	*
20	-5.38	12.40
21	4.84	10.14
22	0.54	14.49
24	16.13	*
25	6.81	14.33
26	7.53	*
27	7.53	*
29	16.13	*
31	2.51	-0.48
32	9.68	19.48
33	3.23	18.84
34	6.45	10.63
35	10.22	18.36
36	7.53	16.91
37	11.29	9.18
38	4.66	*
39	13.26	*
40	5.91	5.31
41	7.53	4.03
42	-5.38	2.74
43	6.81	7.89
44	20.43	25.93
45	13.98	*
46	2.15	9.18
47	1.08	2.90

Isolado	Inibição ao 7° dia (%)	Inibição no 15° dia (%)
48	15.59	*
49	1.61	9.18
50	4.66	*
51	10.75	31.72
52	5.91	3.38
53	4.30	*
54	6.99	6.76
55	2.51	*
56	2.69	6.76
57	5.38	12.40
60	4.84	14.01
61	6.81	*
62	7.53	7.25
63	17.56	*
64	9.68	*
LGMF1254	37.63	60.39
66	12.90	13.04
67	12.37	6.60
68	3.23	*
1068	9.68	23.35
Controle -	100.00	100.00

* Dados perdidos devido ao crescimento micelial sobre toda placa.

APÊNDICE 2.1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS AO 7º DIA

Cochran's C test: 0.128633 P-Value = 0.00625737
 Bartlett's test: 1.60436 P-Value = 0.365489
 Hartley's test: 270.0
 Levene's test: 0.903694 P-Value = 0.667749

Isolado	Count	Average	Variance	Standard deviation
Controle +	4	17.25	0.416667	0.645497
1	3	15.0	1.75	1.32288
2	4	15.25	0.75	0.866025
3	3	14.8333	0.0833333	0.288675
4	3	16.5	6.75	2.59808
6	3	16.1667	1.58333	1.25831
9	3	16.1667	1.58333	1.25831
10	4	15.125	2.72917	1.65202
11	4	17.625	6.22917	2.49583
12	4	16.875	1.72917	1.31498
13	3	15.0	1.75	1.32288
14	3	12.5	2.25	1.5

Isolado	Count	Average	Variance	Standard deviation
15	3	15.0	0.25	0.5
17	4	13.625	2.22917	1.49304
19	3	14.3333	1.58333	1.25831
20	3	18.5	1.75	1.32288
21	4	16.125	5.39583	2.32289
22	4	17.125	4.0625	2.01556
24	3	13.5	0.25	0.5
25	3	15.6667	7.58333	2.75379
26	3	15.5	1.0	1.0
27	3	15.5	1.0	1.0
29	4	13.5	1.5	1.22474
31	3	16.6667	2.08333	1.44338
32	3	15.0	0.0	0.0
33	4	16.5	0.666667	0.816497
34	4	15.75	1.08333	1.04083
35	4	14.875	1.5625	1.25
36	4	15.5	2.16667	1.47196
37	4	14.625	0.895833	0.946485
38	3	16.1667	6.58333	2.5658
39	3	14.1667	0.583333	0.763763
40	4	15.875	1.22917	1.10868
41	3	15.5	0.0	0.0
42	3	18.5	16.75	4.09268
43	3	15.6667	0.583333	0.763763
44	3	12.5	3.25	1.80278
45	3	14.0	3.25	1.80278
46	4	16.75	0.75	0.866025
47	4	17.0	1.16667	1.08012
48	4	13.625	1.89583	1.37689
49	4	16.875	2.22917	1.49304
50	3	16.1667	1.33333	1.1547
51	4	14.75	6.75	2.59808
52	4	15.875	1.39583	1.18145
53	4	16.25	2.25	1.5
54	4	15.625	1.22917	1.10868
55	3	16.6667	3.08333	1.75594
56	4	16.625	3.0625	1.75
57	3	16.0	1.0	1.0
60	4	16.125	5.22917	2.28674
61	3	15.6667	4.08333	2.02073
62	3	15.5	1.0	1.0
63	3	13.1667	1.58333	1.25831
64	4	15.0	0.833333	0.912871
LGMF1254	4	8.5	22.5	4.74342
66	4	14.25	4.41667	2.10159
67	4	14.375	1.72917	1.31498
68	3	16.5	4.75	2.17945
1068	3	15.0	7.75	2.78388
Controle -	4	0.0	0.0	0.0
Total	213	15.1174	8.92956	2.98824

APÊNDICE 2.2 - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS PARA TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS AO 7º DIA

Isolado	Sample Size	Average Rank
Controle +	4	177.125
1	3	87.5
2	4	103.875
3	3	80.0
4	3	128.5
6	3	137.5
9	3	137.5
10	4	90.125
11	4	166.125
12	4	160.25
13	3	87.5
14	3	23.6667
15	3	89.3333
17	4	46.375
19	3	67.6667
20	3	197.5
21	4	133.875
22	4	159.125
24	3	32.6667
25	3	124.667
26	3	111.833
27	3	111.833
29	4	41.0
31	3	152.833
32	3	88.5
33	4	153.375
34	4	122.25
35	4	84.625
36	4	114.25
37	4	72.25
38	3	122.0
39	3	54.3333
40	4	126.5
41	3	116.5
42	3	162.167
43	3	120.333
44	3	25.0
45	3	64.3333
46	4	162.0
47	4	167.0
48	4	47.125
49	4	158.625
50	3	139.333
51	4	89.5
52	4	125.25
53	4	137.375
54	4	115.25
55	3	149.0
56	4	147.375
57	3	132.667
60	4	119.125
61	3	118.333
62	3	111.833
63	3	33.3333
64	4	90.5
LGMF1254	4	15.375
66	4	69.5
67	4	71.625
68	3	137.0
1068	3	92.8333
Controle -	4	2.5

Test statistic = 113.242 P-Value = 0.000039539

APÊNDICE 2.3 – TESTE LSD PARA TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS AO 7º DIA

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
-----

```

Isolado	Count	Mean	Homogeneous Groups
Controle -	4	0.0	X
LGMF1254	4	8.5	X
14	3	12.5	X
44	3	12.5	X
63	3	13.1667	XX
29	4	13.5	XXX
24	3	13.5	XXXX
48	4	13.625	XXXX
17	4	13.625	XXXX
45	3	14.0	XXXXX
39	3	14.1667	XXXXXX
66	4	14.25	XXXXX
19	3	14.3333	XXXXXXX
67	4	14.375	XXXXXXX
37	4	14.625	XXXXXXX
51	4	14.75	XXXXXXX
3	3	14.8333	XXXXXXXXXX
35	4	14.875	XXXXXXXXXX
1068	3	15.0	XXXXXXXXXX
15	3	15.0	XXXXXXXXXX
13	3	15.0	XXXXXXXXXX
32	3	15.0	XXXXXXXXXX
1	3	15.0	XXXXXXXXXX
64	4	15.0	XXXXXXXXXX
10	4	15.125	XXXXXXXXXX
2	4	15.25	XXXXXXXXXX
36	4	15.5	XXXXXXXXXX
62	3	15.5	XXXXXXXXXX
27	3	15.5	XXXXXXXXXX
26	3	15.5	XXXXXXXXXX
41	3	15.5	XXXXXXXXXX
54	4	15.625	XXXXXXXXXX
61	3	15.6667	XXXXXXXXXX
25	3	15.6667	XXXXXXXXXX
43	3	15.6667	XXXXXXXXXX
34	4	15.75	XXXXXXXXXX
52	4	15.875	XXXXXXXXXX
40	4	15.875	XXXXXXXXXX
57	3	16.0	XXXXXXXXXX
60	4	16.125	XXXXXXXXXX
21	4	16.125	XXXXXXXXXX
38	3	16.1667	XXXXXXXXXX
9	3	16.1667	XXXXXXXXXX
6	3	16.1667	XXXXXXXXXX
50	3	16.1667	XXXXXXXXXX
53	4	16.25	XXXXXXXXXX
68	3	16.5	XXXXXXXXXX
33	4	16.5	XXXXXXXXXX
4	3	16.5	XXXXXXXXXX
56	4	16.625	XXXXXXXXXX
55	3	16.6667	XXXXXXXXXX
31	3	16.6667	XXXXXXXXXX
46	4	16.75	XXXXXX
49	4	16.875	XXXXXX
12	4	16.875	XXXXXX
47	4	17.0	XXXXXX
22	4	17.125	XXXX
Controle +	4	17.25	XXX
11	4	17.625	XX
42	3	18.5	X
20	3	18.5	X

```

-----

```

APÊNDICE 03 – ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS AO 14º DIA

Variance Check

Cochran's C test: 0.180008 P-Value = 0.00337321
 Bartlett's test: 1.80454 P-Value = 0.0885283
 Hartley's test: 339.0
 Levene's test: 0.942221 P-Value = 0.576024

Summary Statistics for Diâmetro

Isolado	Count	Average	Variance	Standard deviation
Controle +	4	25.875	2.0625	1.43614
1	3	18.1667	2.58333	1.60728
2	3	23.5	2.25	1.5
3	3	17.5	2.25	1.5
4	3	20.0	3.0	1.73205
6	3	25.0	10.75	3.27872
9	3	23.1667	1.58333	1.25831
10	4	20.75	4.41667	2.10159
11	4	20.5	1.0	1.0
12	4	23.75	1.75	1.32288
13	4	20.5	3.0	1.73205
15	3	20.1667	3.58333	1.89297
20	3	22.6667	3.58333	1.89297
21	4	23.25	4.25	2.06155
22	4	22.125	2.72917	1.65202
25	3	22.1667	5.58333	2.36291
31	3	26.0	3.25	1.80278
32	3	20.8333	0.333333	0.57735
33	3	21.0	3.25	1.80278
34	4	23.125	1.5625	1.25
35	4	21.125	2.39583	1.54785
36	4	21.5	2.16667	1.47196
37	4	23.5	1.66667	1.29099
40	4	24.5	1.0	1.0
41	3	24.8333	0.583333	0.763763
42	3	25.1667	15.0833	3.88373
43	3	23.8333	0.0833333	0.288675
44	3	19.1667	0.583333	0.763763
46	4	23.5	2.5	1.58114
47	4	25.125	0.729167	0.853913
49	3	23.5	4.75	2.17945
51	3	17.6667	10.3333	3.21455
52	4	25.0	0.5	0.707107
54	4	24.125	2.72917	1.65202
56	4	24.125	2.72917	1.65202
57	3	22.6667	0.0833333	0.288675
60	4	22.25	8.25	2.87228
62	3	24.0	0.75	0.866025
LGMF1254	4	10.25	28.25	5.31507
66	4	22.5	7.83333	2.79881
67	3	24.1667	0.583333	0.763763
1068	3	19.8333	0.583333	0.763763
Controle -	4	0.0	0.0	0.0

APÊNDICE 3.1 - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS PARA TESTE DE METABÓLITOS VOLÁTEIS AO 14º DIA

Isolado	Sample Size	Average Rank
Controle +	4	133.375
1	3	18.8333
2	3	95.0
3	3	14.3333
4	3	35.6667
6	3	110.167
9	3	88.1667
10	4	47.75
11	4	41.125
12	4	98.875
13	4	42.75
15	3	39.0
20	3	80.3333
21	4	88.75
22	4	69.75
25	3	71.6667
31	3	132.833
32	3	46.5
33	3	49.8333
34	4	87.125
35	4	51.875
36	4	57.5
37	4	94.875
40	4	116.375
41	3	122.167
42	3	106.333
43	3	101.167
44	3	23.5
46	4	95.625
47	4	126.75
49	3	92.6667
51	3	21.0
52	4	125.75
54	4	106.75
56	4	106.75
57	3	76.6667
60	4	72.625
62	3	106.0
LGMF1254	4	7.125
66	4	77.5
67	3	108.667
1068	3	32.5
Controle -	4	2.5

Test statistic = 107.015 P-Value = 1.38176E-7

APÊNDICE 3.3 – TESTE LSD PARA METABÓLITOS VOLÁTEIS AOS 14 DIAS

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
Isolado      Count      Mean      Homogeneous Groups
-----
Controle -   4          0.0      X
LGMF1254    4          10.25    X
3            3          17.5     X
51           3          17.6667 XX
1            3          18.1667 XXX
44           3          19.1667 XXXX
1068        3          19.8333 XXXXX
4            3          20.0     XXXXX
15           3          20.1667 XXXXXX
11           4          20.5     XXXXXX
13           4          20.5     XXXXXX
10           4          20.75    XXXXXX
32           3          20.8333 XXXXXXX
33           3          21.0     XXXXXXXX
35           4          21.125  XXXXXXXX
36           4          21.5     XXXXXXXX
22           4          22.125  XXXXXXXX
25           3          22.1667 XXXXXXXXX
60           4          22.25   XXXXXXXX
66           4          22.5    XXXXXXXXX
20           3          22.6667 XXXXXXXXX
57           3          22.6667 XXXXXXXXX
34           4          23.125  XXXXXXXX
9            3          23.1667 XXXXXXXXX
21           4          23.25   XXXXXXXXX
49           3          23.5    XXXXXXXXX
46           4          23.5    XXXXXXXX
2            3          23.5    XXXXXXXXX
37           4          23.5    XXXXXXXX
12           4          23.75   XXXXXXXX
43           3          23.8333 XXXXXXXX
62           3          24.0    XXXXXXXX
56           4          24.125  XXXXXXXX
54           4          24.125  XXXXXXXX
67           3          24.1667 XXXXXXXX
40           4          24.5    XXXXXX
41           3          24.8333 XXXXXX
6            3          25.0    XXXXXX
52           4          25.0    XXXX
47           4          25.125  XXX
42           3          25.1667 XXXX
Controle +   4          25.875  X
31           3          26.0    XX

```

APÊNDICE 04 – ESTATÍSTICA PARA O TESTE DE METABÓLITOS DIFUSÍVEIS

Variance Check

Cochran's C test: 0.245031 P-Value = 0.228689
 Bartlett's test: 1.68691 P-Value = 0.00376907
 Hartley's test: 90.0
 Levene's test: 2.55583 P-Value = 0.0168117

Summary Statistics for Diâmetro

Treatament	Count	Average	Variance	Standard deviation
1075	6	7.5	0.775	0.88034
14	6	5.375	1.19375	1.09259
23	6	7.4166	0.46666	0.68313
45	6	4.3333	0.54166	0.73598
58	6	9.0833	3.01667	1.73686
LGMF1254	6	9.5	3.75	1.93649
7	6	4.3333	1.29167	1.13652
Controle + (clorof)	6	11.0833	0.76666	0.87559
Controle + (sem clorof)	6	16.7917	3.46042	1.86022
Controle -	6	0.0833	0.04166	0.20412
Total	60	7.55	20.1352	4.48722

APÊNDICE 4.1 – TESTE Kruskal-Wallis PARA O TESTE DE METABÓLITOS DIFUSÍVEIS

Treatament	Sample Size	Average Rank
1075	6	32.4167
14	6	18.9167
23	6	32.6667
45	6	13.3333
58	6	40.0833
LGMF1254	6	42.75
7	6	14.5833
Controle + (clorof)	6	49.25
Controle + (sem clorof)	6	57.5
Controle -	6	3.5

Test statistic = 54.0921 P-Value = 1.81323E-8

APÊNDICE 4.2 – TESTE LSD PARA OS DADOS DO TESTE DE METABÓLITOS DIFUSÍVEIS

Method: 95.0 percent LSD

Treatament	Count	Mean	Homogeneous Groups
Controle -	6	0.0833333	X
45	6	4.33333	X
7	6	4.33333	X
14	6	5.375	X
23	6	7.41667	X
1075	6	7.5	X
58	6	9.08333	X
LGMF1254	6	9.5	X
Controle+ (clor.)	6	11.0833	X
Controle+	6	16.7917	X

APÊNDICE 5 – ESTATÍSTICA PARA DADOS DO TESTE DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DOS VOLÁTEIS

ANÁLISE AO 7º DIA

Kruskal-Wallis Test for Diâmetro by Tratamento

Tratamento	Sample Size	Average Rank
Arroz	7	34.7857
Aveia	7	21.2143
BDA	7	15.2143
Citros	7	36.9286
Completo	7	13.6429
Controle	7	53.0
MEA	7	30.7143
Milho	7	22.5

Test statistic = 31.8567 P-Value = 0.0000431777

Method: 95.0 percent LSD

Meio	Count	Mean	Homogeneous Groups
Completo	7	4.28571	a
BDA	7	4.42857	a
Aveia	7	4.82143	a
Milho	7	5.32143	ab
MEA	7	5.5	ab
Arroz	7	6.39286	b
Citros	7	6.57143	b
Controle	7	14.3571	c

ANÁLISE AO 10º DIA

Kruskal-Wallis Test

Meio	Sample Size	Average Rank
Arroz	7	35.0714
Aveia	7	21.8571
BDA	7	12.4286
Completo	7	14.5
Controle	7	53.0
MEA	7	28.1429
Milho	7	24.1429
citros	7	38.8571

Test statistic = 33.5074 P-Value = 0.0000212923

Method: 95.0 percent LSD

Meio	Count	Mean	Homogeneous Groups
BDA	7	4.21429	a
Completo	7	4.35714	a
Aveia	7	4.92857	ab
MEA	7	5.42857	abc
Milho	7	5.46429	abc
Arroz	7	6.5	bc
citros	7	6.89286	c
Controle	7	17.1071	d

ANÁLISE AO 14º DIA

Kruskal-Wallis Test for Diâmetro by Meio

Meio	Sample Size	Average Rank
Arroz	7	34.5714
Aveia	7	21.4286
BDA	7	13.2143
Citros	7	40.5714
Completo	7	15.5
Controle	7	53.0
MEA	7	27.7143
Milho	7	22.0

Test statistic = 33.7702 P-Value = 0.0000190162

Method: 95.0 percent LSD

Meio	Count	Mean	Homogeneous Groups
BDA	7	4.25	a
Completo	7	4.42857	a
Aveia	7	4.85714	ab
Milho	7	5.39286	ab
MEA	7	5.42857	ab
Arroz	7	6.39286	bc
Citros	7	7.71429	c
Controle	7	19.8571	d

ANÁLISE AO 21º DIA

Kruskal-Wallis Test for Col_21 dias

Meio	Sample Size	Average Rank
Arroz	6	26.75
Aveia	6	14.5
BDA	6	14.0
Completo	6	12.4167
MEA	6	24.5833
Milho	6	21.75
Testemunha	6	45.5
citros	6	36.5

Test statistic = 29.2929 P-Value = 0.00012793

Análise aos 21 dias

Method: 95.0 percent LSD

Meio	Count	Mean	Homogeneous Groups
Completo	6	4.45833	a
BDA	6	4.625	a
Aveia	6	4.70833	a
MEA	6	5.70833	a
Milho	6	6.20833	a
Arroz	6	6.625	a
citros	6	10.25	b
Testemunha	6	23.5833	c

APÊNDICE 6 – ESTATÍSTICA PARA DIÂMETRO DA COLÔNIA AO 10º DIA

Summary Statistics for Diâmetro

Meio	Count	Average	Variance	Standard deviation
Arroz	7	19.9286	7.47321	2.73372
Aveia	7	15.2143	8.82143	2.97009
BDA	7	22.5	1.60417	1.26656
Citros	7	18.3571	5.95536	2.44036
Completo	7	15.8929	1.83036	1.35291
MEA	7	14.4643	4.3006	2.07379
Milho	7	14.2143	12.3006	3.50722
Total	49	17.2245	13.8782	3.72535

Variance Check

Cochran's C test: 0.290892 P-Value = 0.297858

Bartlett's test: 1.25169 P-Value = 0.181265

Hartley's test: 7.6679

Levene's test: 1.34598 P-Value = 0.258733

APÊNDICE 6.1 – ANOVA PARA O DIÂMETRO DA COLÔNIA DO ISOLADO LGMF1254 AO 10º DIA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	412.441	6	68.7402	11.38	0.0000
Within groups	253.714	42	6.04082		
Total (Corr.)	666.156	48			

APÊNDICE 6.2 – TESTE TUKEY PARA O DIÂMETRO DA COLÔNIA DO ISOLADO LGMF1254 AO 10º DIA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Multiple Range Tests for Diâmetro by Meio de cultura

Method: 95.0 percent LSD

Meio de cultura Count Mean Homogeneous Groups

Milho	7	14.2143	X
MEA	7	14.4643	X
Aveia	7	15.2143	X
Completo	7	15.8929	XX
Citros	7	18.3571	XX
Arroz	7	19.9286	XX
BDA	7	22.5	X

APÊNDICE 6.3 – DADOS REFERENTES AO DIÂMETRO DA COLÔNIA DO ISOLADO LGMF1254 AO 14º DIA

Summary Statistics for Diâmetro

Meio	Count	Average	Variance	Standard deviation
Aveia	7	24.5	7.75	2.78388
BDA	7	33.4643	4.5506	2.13321
MEA	7	21.8214	9.72321	3.11821
Milho	7	23.6071	7.76786	2.78709
citros	7	27.3929	5.41369	2.32673
completo	7	23.9643	2.32143	1.52362
Total	42	25.7917	20.3412	4.51012

Variance Check

Cochran's C test: 0.259101 P-Value = 0.864088
 Bartlett's test: 1.10171 P-Value = 0.657683
 Hartley's test: 4.18846
 Levene's test: 0.562943 P-Value = 0.727624

APÊNDICE 6.4 - ANOVA PARA O DIÂMETRO DA COLÔNIA DO ISOLADO LGMF1254 AO 14º DIA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	608.829	5	121.766	19.47	0.0000
Within groups	225.161	36	6.25446		
Total (Corr.)	833.99	41			

APÊNDICE 6.5 – TESTE TUKEY PARA O DIÂMETRO DA COLÔNIA DO LGMF1254 AO 14º DIA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Multiple Range Tests for Diâmetro by Meio de cultura

Method: 95.0 percent LSD

Meio de cultura	Count	Mean	Homogeneous Groups
Milho	7	14.2143	X
MEA	7	14.4643	X
Aveia	7	15.2143	X
Completo	7	15.8929	XX
Citros	7	18.3571	XX
Arroz	7	19.9286	XX
BDA	7	22.5	X

APÊNDICE 6.6 ANÁLISE DA VARIÂNCIA REFERENTE A INFLUÊNCIA DA DURAÇÃO DO TRATAMENTO NA INIBIÇÃO DE *P. citricarpa*

Aveia

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.161012	3	0.0536706	0.03	0.9936
Within groups	44.6457	23	1.94112		
Total (Corr.)	44.8067	26			

BDA

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.697388	3	0.232463	0.87	0.4732
Within groups	6.17946	23	0.268672		
Total (Corr.)	6.87685	26			

Completo

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.119213	3	0.0397377	0.03	0.9934
Within groups	32.3021	23	1.40444		
Total (Corr.)	32.4213	26			

APÊNDICE 7 – ESTATÍSTICA PARA DADOS DO TESTE DE FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS

Variance Check

Cochran's C test: 0.999983 P-Value = 0.0
 Bartlett's test: 123.02 P-Value = 0.0
 Hartley's test: 60533.9
 Levene's test: 17.9936 P-Value = 0.0000108019

Summary Statistics for Média

Tratamento	Count	Average	Variance	Standard deviation
Controle negativo	10	0.0666667	0.0444444	0.210819
Controle positivo	10	215.334	2690.4	51.869
Tratamento	10	0.0	0.0	0.0
Total	30	71.8002	11491.1	107.197

Tratamento	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
Controle negativo	0.0	0.666667	0.666667	4.08248
Controle positivo	149.0	312.67	163.67	0.781559
Tratamento	0.0	0.0	0.0	
Total	0.0	312.67	312.67	2.22745

APÊNDICE 7.1 – TESTE KRUSKAL-WALLIS PARA DADOS DO TESTE DE FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS

Tratamento	Sample Size	Average Rank
Controle negativo	10	11.0
Controle positivo	10	25.5
Tratamento	10	10.0

Test statistic = 26.0179 P-Value = 0.00000224021

APÊNDICE 7.2 – TESTE TUKEY PARA TESTE DE FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
Tratamento	Count	Mean	Homogeneous Groups----
Tratamento	10	0.0	X
Controle -	10	0.0666667	X
Controle +	10	215.334	X

APÊNDICE 8 - TESTE BINOMIAL DE FISHER NA VIABILIDADE DOS FRAGMENTOS DE MICÉLIO DE *P. citricarpa* APÓS O TESTE DE PICNÍDIOS

TAMANHO DA AMOSTRA	=30
NÚMERO DE SINAIS POSITIVOS	=29
NÚMERO DE SINAIS NEGATIVOS	=0
NÚMERO DE ESCORES EMPATADOS	=1
P (BINOMIAL)	=0.0000
PODER DO TESTE	=1.0000
EFICIENTE EM 97% (P< 0,0001) 0,05%	

APÊNDICE 8 - TESTE DE LESÃO INDUZIDA

Variance Check

Cochran's C test: 0.385485 P-Value = 0.415244
 Bartlett's test: 1.13819 P-Value = 0.671062
 Hartley's test: 4.38824
 Levene's test: 0.425123 P-Value = 0.78869

APÊNDICE 8.1 - ANOVA PARA DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES ENTRE FRUTOS AMARELOS E VERDES DO GRUPO CONTROLE

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	85.3984	4	21.3496	6.33	0.0018
Within groups	67.4731	20	3.37366		
Total (Corr.)	152.872	24			

Multiple Range Tests for diametros by controles

Method: 95.0 percent Tukey HSD

controles	Count	Mean	Homogeneous Groups
C2 vd	5	7.174	x
controle08	5	7.932	x
controle10	5	8.237	x
Controle 9 vd	5	10.234	xx
controle 07	5	12.262	x

APÊNDICE 8.2 - TESTE DE LESÃO INDUZIDA - ANOVA ENTRE FRUTOS AMARELOS E VERDES DO GRUPO TRATAMENTO

Variance Check

Cochran's C test: 0.479102 P-Value = 0.130976
 Bartlett's test: 1.72549 P-Value = 0.0418254
 Hartley's test: 21.9352
 Levene's test: 1.68336 P-Value = 0.193258

Kruskal-Wallis Test for medias by trat

trat	Sample Size	Average Rank
t01	5	16.2
t10	5	11.4
t3	5	7.8
t6	5	17.2
t7	5	12.4

Test statistic = 5.33908 P-Value = 0.254241

APÊNDICE 8.3 - ANOVA PARA DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES ENTRE GRUPO CONTROLE E TRATAMENTO - TESTE DE LESÃO INDUZIDA

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	1	46.77486	46.77486	7.6051 **
Resíduo	33	202.96514	6.15046	
Total	34	249.74000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)
 * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)
 ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
1	33	7.4722	7.6051	0.0094

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	6.14500	b	nr = 25
2	8.70400	a	nr = 10

dms = $5.04119 \times \text{RaizQuadrada}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t ao nível de 5% de probabilidade

MG = 6.87614 CV% = 36.07
 Ponto médio = 6.34000

APÊNDICE 9 – VOLUME DISPONÍVEL EM CADA RECIPIENTE PARA O TESTE DE LESÃO INDUZIDA EM FRUTOS

Fruto	Altura do meio cultura (cm)	Diâmetro do fruto (cm)	raio	Volume ocupado pelo meio de cultura	Volume do fruto	Volume disponível (cm ³)
1T	1.20	6.15	3.075	94.2	39.5876	561.512
3T	1.10	6.05	3.025	86.4	38.3106	570.639
6T	1.30	7.00	3.500	102.1	51.2867	541.963
7T	1.30	7.25	3.625	102.1	55.0154	538.235
10T	1.00	7.35	3.675	78.5	56.5436	560.256

APÊNDICE 10 - RELAÇÃO VOLUME DISPONÍVEL E TAMANHO DA LESÃO

FRUTO	VOLUME OCUPADO	MÉDIA LESÃO MM
7T	538.2346	6.139
6T	541.9633	7.140
10T	560.2565	6.643
1T	561.5125	7.177
3T	570.6394	4.955

APÊNDICE 11 - TESTE MAN WITNEY PARA O TESTE COM FRUTOS TENDENCIOSOS

H0: Amostra-1 = Amostra-2

Ao nível de 5% de probabilidade
 U = 74.00 Ukrit(5%) = 49.00
 p-valor > 0.05 H0 não rejeitada
 As amostras não são diferentes

Ao nível de 10% de probabilidade
 U = 74.00 Ukrit(10%) = 55.00
 p-valor > 0.10 H0 não rejeitada
 As amostras não são diferentes

APÊNDICE 12 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

ÁGAR BATATA DEXTROSE (BDA)

Batatas	200g
Dextrose	20g
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada por 20 a 30 minutos em forno de micro-ondas. Após filtração, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água

destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5,8 ou 6,8 com HCl ou NaOH. Logo após adicionou-se o ágar e autoclavou-se por 20 minutos a 1 atm.

MEIO COMPLETO – (AZEVEDO ; COSTA ,1973)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Glicose	10 g
Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL
Agar	15 g

Todos os ingredientes exceto o ágar, foram misturados em água destilada sob agitação. O pH foi ajustado para 6,8 com HCl ou NaOH. Em seguida adicionou-se o ágar, foi autoclavado a 121 graus Celsius a 1 atm por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

Solução de vitaminas

Ácido p-aminobenzóico	10 mg
Piridoxina	50 mg
Tiamina	10 mg
Ácido nicotínico	100 mg
Biotina	0,2 mg
Riboflavina	100 mg
H ₂ O	100 ml

Aquecer em banho maria a 100° C por 15 minutos e resfriar. Adicionar 5 mL de clorofórmio. Guardar ao abrigo da luz a 4° C.

MEIO CITROS (STRINGARI, 2009)

Folhas de Citros	28 g
Ágar	15 g
Glicose	20 g
Água destilada	1000 mL

As folhas foram autoclavadas em 800 mL de água destilada. Em seguida o líquido foi filtrado, adicionaram-se os demais ingredientes e completou-se o volume para 1000 mL. Em seguida autoclavou-se a 1 atmosfera durante 20 minutos a 121° C. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 N.

MEIO MILHO (KURTZMAN; FEEL,1998)

Grãos de milho triturado	42 g
Água destilada	1000 ml
Ágar	12 g

Cozeu-se o milho triturado em água destilada em média temperatura por uma hora. Filtrou-se e completou-se o volume para um litro. Adicionou-se o ágar e autoclavou-se por 20 minutos a 1 atm.

MEIO ARROZ (KURTZMAN; FEEL, 1998)

Grãos de arroz	20 g
Água destilada	1000 ml
Ágar	20 g

Cozeu-se o arroz em água destilada durante 45 minutos. O volume foi filtrado e o completado para 1 litro. Adicionou-se o ágar e autoclavou-se por 20 minutos a 1 atm.

MEIO ÁGAR-AVEIA (HOEKSTRA ; APTROOT, 1988)

Aveia em flocos	20 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
Ágar	15 g

A aveia foi adicionada em 1000 mL de água destilada e aquecida por 20 minutos em forno microondas ou por duas horas em fogo baixo. A solução foi filtrada em gaze e o volume completado para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.