

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVELYN OLIVEIRA DE SOUZA



**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Muscodor***

CURITIBA

2016

EVELYN OLIVEIRA DE SOUZA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Muscodor***

Monografia apresentada à disciplina BIO028 – Estágio Supervisionado em Biologia (300h) como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Kava

**Co-orientadora:** MSc. Lorena Carolina Peña

CURITIBA

2016

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

EVELYN OLIVEIRA DE SOUZA

### **BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS DO GÊNERO *Muscodor* EM ESPÉCIES VEGETAIS**

Monografia aprovada como quesito para a aprovação na disciplina Estágio Supervisionado em Biologia – BIO028 do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Kava

Orientadora – Departamento de Genética – UFPR

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Claudia Bonatto

Departamento de Genética – UFPR

MSc. Lorena Carolina Peña

Departamento de Genética – UFPR

Curitiba, 10 de Junho de 2016

*À minha filha Leona que tem me  
acompanhado e me dado forças para seguir  
em frente durante todo este caminho.*

*DEDICO*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Vanessa Kava pela oportunidade e pelas valiosas orientações.

À minha coorientadora Lorena Carolina Peña e ao meu colega de Iniciação Científica, Gustavo Jungklaus, pelos ensinamentos, ideias e por toda a ajuda na execução dos experimentos, sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

À Professora Ana Claudia Bonatto que tão prestativamente aceitou compor a minha banca e avaliar este trabalho.

A Fabiene Faiffer, Gustavo Genelhould, Mateus Passos, Paloma Gerlach e Fernando José pela amizade, carinho, compreensão e companheirismo ao longo de toda a graduação.

À minha amiga Luzia Manfredini que gentilmente me ajudou com a tradução do resumo.

Aos colegas do LabGeM, Allan, Bruno, Desirrê, Elvio, Franciele, Maicon, Mírian e Rodrigo, por toda ajuda, ensinamentos e bons momentos que pudemos passar trabalhando juntos.

Aos Professores Barbara Moura, Carolina Oliveira, Emygdio Monteiro, Fernando Louzada, João Carlos Magalhães, Luciano Felicio, Marcio Pie, Paulo de Tarso e Thelma Ludwig pelo exemplo de dedicação e amor pela ciência e pela docência.

Ao Leandro, por todo carinho, amor, apoio e incentivo para nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais e avós, Rejane, Arlei, Anair e Antenor, por todo amor e por nunca deixarem de acreditar em mim.

Muito obrigada!

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,  
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.”*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

Fungos endofíticos do gênero *Muscodor* são conhecidos por produzirem compostos orgânicos voláteis, que têm propriedades antifúngicas e antibacterianas, o que os tornam aptos para o controle biológico de patógenos, especialmente de pós-colheita. Trabalhos anteriores apresentam isolados deste gênero, obtidos no Brasil, com capacidade de inibir *in vitro* o crescimento do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, causador da mancha preta dos citros (MPC). Os objetivos deste trabalho foram bioprospectar e identificar novos isolados de *Muscodor* em plantas de interesse comercial e/ou uso medicinal; caracterizar a morfologia dos isolados e verificar seu potencial uso para o biocontrole de fungos fitopatogênicos. Foram realizados isolamentos com onze espécies vegetais: Laranja doce (*Citrus sinensis*), Lima da pérsia (*Citrus limettioides*), Limão cravo (*Citrus bigaradia*), Café (*Coffea* sp.), Espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), Perpétua do Brasil (*Alternanthera brasiliana*), Hortelã (*Mentha* sp.), Ginkgo Biloba (*Ginkgo biloba*), Boldo (*Plectranthus barbatus*), Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e Pata de vaca (*Bauhinia forficata*). Em média, foram desinfestadas superficialmente dez folhas por espécie vegetal e quatro fragmentos de folha (1cm<sup>2</sup>), escolhidos aleatoriamente, foram depositados em placas de Petri com meio BDA, contendo um inóculo do fungo *Muscodor* sp., isolado LGMF1254 da coleção do LabGeM, com cinco dias de crescimento a 25 °C. De cada espécie vegetal foram preparadas de 9 a 12 placas. De todas as plantas foram obtidos isolados fúngicos, porém nove apresentaram morfologia compatível com este gênero, sendo cinco obtidos das folhas de *A. brasiliana*, dois de *C. limettioides* e dois de *Coffea* sp. Estes nove isolados foram utilizados em testes de antagonismo contra os fitopatógenos *Phyllosticta citricarpa* (25 °C), *Penicillium digitatum* (25 °C) e *Colletotrichum graminicola* (23 °C). Nos tratamentos, os patógenos foram inoculados em placas de Petri com meio BDA contendo os isolados já com cinco dias de crescimento. Como controle, foi inoculado somente o patógeno. Todas as combinações foram preparadas com cinco replicatas. Os resultados foram avaliados com os programas ImageJ, para a medição da área das colônias, e Assistat, para a análise estatística, onde foi feita a ANOVA (Análise de Variância) e o teste de Tukey para as médias ou Kruskal-Wallis, quando necessário. As análises foram realizadas a cada sete dias para *P. citricarpa* e a cada dois dias para os demais patógenos. Os isolados 33F4 e 107F2, obtidos de *A. brasiliana* e *Coffea* sp. respectivamente, apresentaram os melhores resultados de inibição do crescimento de *P. digitatum*, e os isolados 28F2 e 106F1, de *C. limettioides* e *Coffea* sp. respectivamente, inibiram significativamente o crescimento de *C. graminicola*. O experimento com *P. citricarpa* segue em andamento. Estes resultados preliminares indica a existência de isolados com capacidade de inibição deste patógeno. Estes resultados indicam que quatro isolados obtidos possuem potencial para uso no controle biológico dos fungos fitopatogênicos. A confirmação da identidade destes isolados como pertencentes ao gênero *Muscodor* está sendo feita com o sequenciamento da região ITS do rDNA.

Palavras-chave: Bioprospecção, controle biológico, fungos endofíticos, plantas medicinais, *Muscodor*, Xilariaceae.

## ABSTRACT

Endophytic fungi from the genus *Muscodor* are known to produce volatile organic compounds (VOCs) with antifungal and antibacterial properties, which make them suitable for biological control of phytopathogens, especially postharvest diseases. Previous works developed by this research group have isolated three strains of this genus in Brazil, with the ability to inhibit *in vitro* the growth of the pathogen *Phyllosticta citricarpa*, the causal agent of the citrus black spot (CBS) disease. The objectives of this study were bioprospect and identify new isolates of *Muscodor* from plants with commercial interest, and/or medicinal use; characterize the morphology of the strains obtained and verify their potential use for the biological control of some plant pathogenic fungi. Isolations were performed in eleven plant species, being: Sweet orange (*Citrus sinensis*), Palestinian sweet lime (*Citrus limettioides*), Rangpur lime (*Citrus bigaradia*), Coffee (*Coffea* sp.), Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*), Penicillin (*Alternanthera brasiliana*), Mint (*Mentha* sp.), Ginkgo Biloba (*Ginkgo biloba*), Indian Coleus (*Plectranthus barbatus*), Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius*), Brazilian orchid tree (*Bauhinia forficata*). In average, ten leaves from each species were superficially disinfected and four fragments (1cm<sup>2</sup>), chosen randomly, were deposited on Petri plates (9 to 12 for each plant) with PDA medium, previously inoculated with *Muscodor* sp., five days of growth at 25 °C. From all the plants were obtained fungal isolates, but only nine presented morphology compatible with this genus, five obtained from the leaves of *A. brasiliana*, two of *C. limettioides* and two of *Coffea* sp. These nine isolates were inoculated in Petri plates with PDA medium and after five days the plant pathogens *Phyllosticta citricarpa* (25 °C), *Penicillium digitatum* (25 °C) and *Colletotrichum graminicola* (23 °C) were inoculated to perform the antagonism tests. As control, only the pathogens were inoculated. All combinations were prepared with five replicates. The results were evaluated with programs ImageJ, for measuring the area of the colonies, and Assistat, for statistical analysis, where the ANOVA (analysis of variance) and Tukey test for medium or Kruskal-Wallis was used when necessary. Analyses were performed at every seven days for *P. citricarpa* during 21 days and the others each two days during 10 days. The 33F4 and 107F2 isolates obtained from *A. brasiliana* and *Coffea* sp. respectively, had the best results for growth inhibition of *P. digitatum* and isolated 28F2 and 106F1, from *C. limettioides* and *Coffea* sp. respectively, significantly inhibited the growth of *C. graminicola*. The experiment with *P. citricarpa* is still in progress. The analysis of these results indicates the existence of endophytes from *A. brasiliana*, *C. limettioides* and *Coffea* sp. capable of inhibiting phytopathogens. This fact highlight that these isolates have potential for its use as biological control agents. The identity of these isolates as belonging to the genus *Muscodor* is being confirmed with the sequencing of the ITS rDNA region.

Key words: Bioprospection, biological control, endophytic fungi, medical plants, *Muscodor*, Xilariaceae.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
3.1 FUNGOS .....	14
3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	14
3.2.1 Gênero <i>Muscodor</i> .....	15
3.3 PLANTAS DE INTERESSE MEDICINAL E/OU ECONÔMICO .....	16
3.3.1 <i>Citrus</i> sp. ....	17
3.3.2 <i>Alternanthera brasiliana</i> .....	18
3.3.3 <i>Mentha</i> sp.....	18
3.3.4 <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	19
3.3.5 <i>Coffea</i> sp. ....	20
3.3.6 <i>Ginkgo biloba</i> .....	21
3.3.7 <i>Plectranthus barbatus</i> .....	22
3.3.8 <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	23
3.3.9 <i>Bauhinia forficata</i> .....	24
3.4 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	25
3.4.1 <i>Phyllosticta citricarpa</i> .....	25
3.4.2 <i>Colletotrichum graminicola</i> .....	26
3.4.3 <i>Penicillium digitatum</i> .....	27
3.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	28
3.6 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POR SEQUENCIAMENTO DE DNA .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 ISOLAMENTO.....	30
4.2 TESTES DE ANTAGONISMO.....	31
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS .....	32
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS .....	33
4.4.1 Extração de DNA.....	33
4.4.2 Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA.....	34

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
5.1 BIOPROSPECÇÃO .....	35
5.2 ANTAGONISMO .....	35
5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	38
5.4 ANÁLISES MOLECULARES.....	45
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>48</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Conhecidos desde o século XIX, microrganismos endofíticos habitam o interior das plantas de forma assintomática. No entanto, a partir da década de 70, verificou-se que muitos fungos endofíticos podem apresentar características que beneficiam a planta, protegendo-a contra insetos, microrganismos patogênicos e até contra herbivoria, pela produção de toxinas, antibióticos, fatores de crescimento e outras substâncias importantes para a sobrevivência do hospedeiro por esses microrganismos (AZEVEDO, 1998).

Atualmente o principal meio utilizado para controlar doenças fúngicas, especialmente de pós-colheita, conter prejuízos na agricultura é pelo uso de fungicidas (NUNES, 2012). O uso de microrganismos no controle biológico de pragas, patógenos e ervas-daninhas é uma forma alternativa aos agroquímicos, pois muitos fungos endofíticos são capazes de produzir metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos (LI; STROBEL, 2001, ZOU; TAN, 2001). Além do uso constante de agroquímicos poder favorecer a seleção de patógenos resistentes e causar prejuízos a saúde humana e de animais, e também contaminar o ambiente (BRENT; HOLLOWAY, 2007, SHARMA; SINGH; SINGH, 2009, LI *et al.*, 2012).

Dentre os fungos endofíticos capazes de produzir metabólitos secundários com atividade biológica estão fungos do gênero *Muscodora* (WORAPONG *et al.*, 2001). Muitos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por fungos deste gênero apresentam ações de inibição ou até de letalidade, em alguns casos, contra outros microrganismos, bactérias e fungos patogênicos humanos e fitopatogênicos, nematódeos e certos insetos (EZRA; HESS; STROBEL, 2004, GRIMME *et al.*, 2007, SUWANNARACH *et al.*, 2010, STROBEL, 2011, SAXENA; MESHAM; KAPOOR, 2014) Por esse motivo, diferentes COVs produzidos por *Muscodora* possuem grande potencial para uso pela indústria biotecnológica e produtores agrícolas, favorecendo o uso em culturas orgânicas. COVs demonstram potencial fitoprotetor para o tratamento de sementes, flores e frutos e outras partes das plantas quando armazenadas ou enquanto são transportadas, reduzindo ou suprimindo lesões e doenças provocadas por microrganismos (WORAPONG; STROBEL; HESS, 2001, STINSON *et al.*, 2003, MERCIER; JIMENEZ, 2004).

Em experimentos anteriores de bioprospecção de endofíticos com capacidade de inibição do crescimento de *Phyllosticta citricarpa*, fungo fitopatogênico causador da mancha preta dos citros (MPC), foram realizados isolamentos de fungos endofíticos de folhas saudáveis de laranja doce, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, de onde foi obtido um isolado fúngico do gênero *Muscodor*, atualmente catalogado como LGMF1254 na coleção de Microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR (LabGeM). Como os COVs produzidos por este gênero são capazes de inibir o crescimento de várias espécies de microrganismos, mas não são capazes de inibir o crescimento de isolados do próprio gênero, o isolado LGMF1254 foi utilizado para favorecer a obtenção de novos exemplares deste gênero. Para isso, foi inoculado conjuntamente com fragmentos foliares previamente desinfestados de aroeira, *Schinus terebinthifolius* Raddi. Foram obtidos mais dois exemplares deste gênero com esta metodologia, que passaram a integrar a coleção de microrganismos do LabGeM, catalogados como LGMF1255 e LGMF1256 (PEÑA, 2014).

Por se tratar de um gênero que apenas recentemente foi descrito (WORAPONG *et al.*, 2001), e por sua característica de não apresentar conídios, estima-se que possam ainda existir muitas espécies desconhecidas abrigadas em outras plantas e com grande potencial de uso biotecnológico. Por isso, justifica-se a importância da obtenção de novos isolados deste gênero, de forma a permitir a compreensão de seu potencial como antagonista a patógenos e também os mecanismos de interação com a planta hospedeira, a fim de aumentar o potencial de biocontrole para que estes possam se tornar uma alternativa real e viável para ser utilizada tanto nas fases de pré e pós-colheita.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter novos isolados de fungos endofíticos do gênero *Muscodor*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos de plantas de interesse com propriedades medicinais e/ou importância econômica.

- Caracterizar os isolados por macromorfologia em meio de cultura e por microscopia.

- Verificar o potencial dos isolados obtidos como antagonistas dos fungos fitopatogênicos *Phyllosticta citricarpa*, *Penicillium digitatum* e *Colletotrichum graminicola*.

- Identificar os isolados promissores por meio do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FUNGOS

Os fungos são organismos heterótrofos unicelulares ou pluricelulares, estes últimos caracterizados pela formação de estruturas filamentosas, as hifas, que constituem o micélio. Na fase reprodutiva, o micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originam os esporos, principais responsáveis pela propagação das espécies (MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010). Formam um grande grupo, diverso e amplamente disseminado de microrganismos, bolores, cogumelos e leveduras. São conhecidas atualmente cerca de 100.000 espécies de fungos, estimando-se a possibilidade de existirem até 1,5 milhões de espécies. Os fungos formam um grupo filogeneticamente distinto de outros organismos, são quimiorganotróficos, geralmente apresentando exigências nutricionais simples, sendo a maioria aeróbia (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os fungos têm características heterotróficas, isto é, não são capazes de realizar fotossíntese, portanto necessitam de material orgânico para sobreviver, sendo a sua nutrição feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas que são produzidas por eles e degradam substratos como, celulose e amido. (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010).

Alguns grupos de fungos são especializados e apresentam a capacidade de reter nematóides, formar relações simbióticas (líquens), nutrir ou proteger plantas (micorrizas e endofíticos) (BORGES, 2016). No entanto, até o momento a descoberta de produtos naturais provenientes do universo microbiano apresenta-se praticamente inexplorada (KUSARI; SPITELLER, 2011) e dentro deste contexto os fungos, em particular os endofíticos, estão sendo vistos como a nova fonte de substâncias úteis na agricultura, indústria alimentícia e farmacêutica (STROBEL; DAISY, 2003).

#### 3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro os diferenciou de patógenos de plantas. Estima-se que das 300 mil espécies de plantas que existem na terra,

cada uma hospede no interior de seus tecidos um ou mais fungos endofíticos (CHOWDHARY *et al.*, 2012).

Geralmente os microrganismos endofíticos adentram as plantas por aberturas naturais e feridas. Uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endofíticos são as raízes, pois a emergência de raízes secundárias laterais sempre é acompanhada por uma lesão, que serve de entrada para os microrganismos. O próprio crescimento das raízes, penetrando o solo, gera abrasões que facilitam a entrada de microrganismos. Outras portas de entrada são aberturas naturais como estômatos e hidatódios, aberturas causadas por insetos e por estruturas de fungos patogênicos, ou ainda por feridas que ocorrem durante a colheita de frutos, podendo haver alguns endofíticos transmitidos por meio de sementes, e neste caso o endofítico pode permanecer alojado na planta hospedeira por toda sua vida (MELO; AZEVEDO, 1998).

Em associações simbióticas, os endofíticos podem produzir ou induzir a produção de metabólitos que podem auxiliar a planta evitando o ataque de herbívoros, no aumento da tolerância a estresses abióticos e no controle de ataque de insetos ou outros patógenos (KAUL *et al.*, 2012; CHANDRA, 2012). A partir da década de 90, os endofíticos começaram a ser estudados pelo seu potencial biotecnológico e seu possível uso para controle de doenças em plantas, por meio da inibição do crescimento de fitopatógenos. Esse tipo de controle biológico já era considerado uma alternativa ao uso de fungicidas, pois fungos que habitam o interior de plantas competem por espaço e nutrientes com patógenos, podendo reduzir o desenvolvimento de doenças (AZEVEDO, 1997).

### 3.2.1 Gênero *Muscodor*

O primeiro fungo do gênero *Muscodor* descrito por Worapong, Strobel e Hess, em 2001, foi *Muscodor albus*, descoberto em uma árvore de canela, *Cinnamomum zeylanicum* Blume, e este despertou um grande interesse dos pesquisadores, pois os compostos produzidos por ele possuem um amplo espectro antimicrobiano (STROBEL, *et al.*, 2001). Atualmente são reconhecidas 19 espécies deste gênero (MYCOBANK, 2016). Estão descritos na literatura: *M. roseus* (WORAPONG *et al.*, 2002), *M. vitigenus* (DAISY *et al.*, 2002), *M. crispans* (MITCHELL *et al.*, 2008), *M. yucatanensis* (GONZÁLEZ *et al.*, 2009),

*M. fengyangensis* (ZHANG *et al.*, 2010), *M. cinnamomi* (SUWANNARACH *et al.*, 2010), *M. sutura* (KUDALKAR *et al.*, 2012), *M. musae*, *M. oryzae*, *M. equiseti* e *M. suthepensis* (SUWANNARACH *et al.*, 2012), *M. kashayum* (MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2013), *M. darjeelingensis* (SAXENA; MESHRAM; KAPOOR; 2014), *M. strobilii* (MESHRAM; SAXENA; KAPOOR, 2014), *M. tigerii* (SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2015), *M. ghoomensis*, *M. indica* e *M. indicus* (MESHRAM; GUPTA; SAXENA, 2015). A espécie *M. coffeanum* (HONGSANAN *et al.*, 2015) e *M. heaveae* estão descritas na literatura, porém ainda não estão relacionada no banco de dados Mycobank (SIRI-UDOM; SUWANNARACH; LUMYONG, 2015). Fungos deste gênero não produzem esporos, e são conhecidos por sua propriedade de produzir diversos COVs, que têm propriedades antifúngicas, antibacterianas e alguns até inseticida (KUDALKAR *et al.*, 2012).

Os fungos do gênero *Muscodor* são conhecidos por seu potencial antagonista contra uma enorme variedade de fungos e bactérias patogênicos, tanto de plantas como de humanos, tais como, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cinnamoni*, *Rhizoctonia solani*, *Ustilago hordei*, *Stagnospora nodorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus fumigatus*, *Verticillium dahliae*, *Goetrichum sp.*, *Botrytis sp.*, *Fusarium sp.*, *Colletotrichum lagenarium*, *Cercospora sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe oryzae*, *Sclerotium rolfsii*, *Didymella bryoniae*, *Magnaporthe oryzae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Bacillus cereus* (ZHANG *et al.*, 2010, STROBEL, 2011, YUAN *et al.*, 2011, KUDALKAR *et al.*, 2012, BANERJEE *et al.*, 2013, MESHRAM; KAPOOR; SAXENA, 2013, SIRI-UDOM; SUWANNARACH; LUMYONG, 2015).

### 3.3 PLANTAS DE INTERESSE MEDICINAL E/OU ECONÔMICO

As plantas medicinais podem ser utilizadas de diversas maneiras e com diferentes propósitos, seja *in natura*, com partes inteiras ou sob a forma para preparação de chás e outros tipos de preparos caseiros. São destinadas ao uso doméstico ou em rituais religiosos, espirituais de cura e transcendência sob a forma pulverizada, extratos brutos ou frações enriquecidas, extratos padronizados, tinturas, extratos fluidos, pós, comprimidos, cápsulas, e ainda, serem submetidas a sucessivos processos de extração e purificação, para isolamento das substâncias de interesse (RATES, 2001).

Plantas medicinais representam uma boa fonte de microrganismos endofíticos com potencial biotecnológico (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010). No entanto, o conhecimento acerca desta variedade de microrganismos e suas propriedades ainda é bastante restrito, tendo em vista a biodiversidade de espécies vegetais que habitam as florestas tropicais e eventualmente podem abrigar inúmeras espécies de microrganismos que podem produzir novos produtos bioativos (STROBEL; DAISY, 2003).

### 3.3.1 *Citrus* sp.

As plantas cítricas (Figura 1) ocupam o primeiro lugar na produção mundial de frutos, sendo as laranjas responsáveis por 64% do volume de produção (NEVES; BOTEON, 1998), e o Brasil é segundo maior produtor de laranja do mundo (FAO, 2016). Seus frutos são consumidos ao natural, em saladas, saladas de frutas, acompanhamento de feijoada, ingrediente de bolos e outros preparados. O pericarpo da laranja (parte branca) seco é usado como tempero e para o preparo de chás. Também sendo utilizados em óleos e cremes corporais para massagem como calmante, banhos de imersão aromáticos, para tratar de calosidades e em pomadas e géis para dermatites e eczemas (FONSECA, 2016).



Figura 1. Exemplar de limão-cravo (*Citrus bigaradia*).  
Fonte: Lorena Carolina Peña, 2016.

### 3.3.2 *Alternanthera brasiliana*

Popularmente conhecidas como “penicilina” ou “perpétua-do-Brasil” as plantas do gênero *Alternanthera*, (família Amaranthaceae), são reconhecidas por suas propriedades farmacológicas, tais como: anti-viral, anti-microbiana, hepatoprotetora, anti-fúngica, anti-diarréica, e analgésica. (FERREIRA *et al.*, 2003). *A. brasiliana* (L.) Kuntze (Figura 2) é uma espécie herbácea perene que se desenvolve nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, em áreas com solos drenados ou encharcados ocupados por lavouras anuais ou perenes (MOREIRA; BRAGANÇA, 2011).



Figura 2. Exemplo de *Alternanthera brasiliana*.  
Fonte: Lorena Carolina Peña, 2016.

### 3.3.3 *Mentha* sp.

O gênero *Mentha* é taxonomicamente complexo, em relação à variação na plasticidade fenotípica e à variabilidade genética. Muitas espécies são capazes de hibridização com outras (HALLIDAY; BEADLE, 1972). Menta é o nome comum de aproximadamente 25 espécies perenes do gênero *Mentha* (Figura 3), família Lamiaceae, que se desenvolvem melhor em regiões de clima temperado, conhecida de família das mentas, pelo fato de as plantas dessa família serem caracterizadas

por suas folhagens aromáticas. As mentas verdadeiras, entretanto, são restritas a pequenos grupos e por muitos híbridos (JOLY, 1998). São cultivadas como ervas, cujas folhas podem ser secas e usadas como flavorizantes e seu óleo essencial é utilizado como aromatizante pelas indústrias farmacêuticas em fragrâncias, na medicina por suas propriedades como anti-séptico, calmante, digestivo, estomáquico e expectorante e também como condimento alimentar.



Figura 3. Exemplar de *Mentha* sp.

Fonte: <[http://loghouseplants.com/plants/wp-content/uploads/2012/01/Mint\\_NativeSpearmint.jpg](http://loghouseplants.com/plants/wp-content/uploads/2012/01/Mint_NativeSpearmint.jpg)>.

Acesso em: 01/06/2016.

#### 3.3.4 *Maytenus ilicifolia*

A *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek é conhecida popularmente como "espinheira-santa", "cancerosa", "cancorosa-de-sete-espinhos" e "maiteno", dentre outros nomes. Nativa do Brasil, *M. ilicifolia* é largamente utilizada na medicina popular, tendo seu uso conhecido a partir da década de 20, desde quando se tem algum registro escrito de sua utilização para combater várias doenças, dentre as quais podem-se destacar, gastrites, úlceras e dispepsias. Possui ações tônicas, analgésicas, anti-sépticas, cicatrizantes, diuréticas e laxativas. Atualmente há estudos que afirmam que a *M. ilicifolia* apresenta, também, atividades antineoplásica, antimicrobiana e atividade imunológica (SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009).



Figura 4. Exemplar de *Maytenus ilicifolia*.

Fonte: <<http://i607.photobucket.com/albums/tt156/curaplantas/0072.jpg>>. Acesso em: 01/06/2016.

### 3.3.5 *Coffea* sp.

O gênero *Coffea*, da família Rubiaceae, se divide em quatro seções, sendo a *Eucoffea* a de maior importância econômica, pois abrange as espécies mais cultivadas para o consumo do café, que apresenta as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre, respondendo, respectivamente, por 70% e 30% do café comercializado no mundo (MELO; SOUZA, 2011). A planta de café (Figura 5) é originada da Etiópia, centro da África. Os manuscritos mais antigos datam de 575 no Yêmen, onde era consumido como fruto in natura. Somente no século XVI, na Pérsia, os primeiros grãos de café foram torrados para transformar-se na bebida que hoje conhecemos. Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional, volume equivalente à soma da produção dos outros seis maiores países produtores. É também o segundo mercado consumidor, atrás somente dos Estados Unidos (ABIC, 2010).

O café é utilizado popularmente como antiemético, antinarcótico, inibidor de apetite, cardio-estimulante, diurético, laxante, relaxante muscular e vaso constritor, e ainda para diminuir os sintomas da asma, constipação, fadiga, enxaqueca, obesidade, paralisia e para o alívio de dores. Além de ser um estimulante bastante conhecido, é utilizado de forma medicinal para potencializar o efeito de outras substâncias presentes no corpo, assim como ajuda a aumentar as ações lenitivas de analgésicos (PLANTAS MEDICINAIS FITOTERAPIA, 2016).



Figura 5. Exemplar de *Coffea* sp.  
Fonte: A autora, 2016.

### 3.3.6 *Ginkgo biloba*

A espécie *Ginkgo biloba* L. (Figura 6) é empregada na medicina tradicional chinesa há séculos, apresentando registros de sua utilização pela medicina popular chinesa em 2800 a.C., para casos de doenças respiratórias, sendo referida como um fóssil vivo (BITENCOURT; MAYER; ZUFFELLATO-RIBAS, 2007). É a única integrante da família Ginkgoaceae (LORENZI; MATOS, 2002). É uma árvore alta e robusta de folhas com ruptura vertical divididas em dois lóbulos, em forma de leque e extremamente resistente. Pertence ao grupo das gimnospermas, com características morfológicas peculiares devido à disposição estrutural das folhas e o sistema vascular relativamente primitivo.

O Ocidente iniciou intensamente a pesquisa de seu uso medicamentoso em meados do século XX, e em 1965 o extrato de *G. biloba* foi introduzido na medicina. A literatura indica o emprego do extrato para os distúrbios do sistema nervoso central e periférico, deficiência da circulação sanguínea e aterosclerose cerebral (MICHEL, 1986).



Figura 6. Exemplar de *Ginkgo biloba*.

Fonte: <[http://www.homeopathyandmore.com/med\\_images/Ginkgo\\_Biloba.jpg](http://www.homeopathyandmore.com/med_images/Ginkgo_Biloba.jpg)>. Acesso em: 01/06/2016.

### 3.3.7 *Plectranthus barbatus*

Vulgarmente conhecido como boldo-do-brasil, malva-santa, sete-dores e tapete-de-oxalá, *Plectranthus barbatus* Andr. (Figura 7), espécie provavelmente originária da África, é amplamente cultivada em todo o Brasil e utilizada tanto na medicina popular como na forma de medicamentos fitoterápicos, por suas propriedades analgésica e antidiarréica a ela atribuídas. Constitui uma das plantas mais citadas em levantamentos etnobotânicos de plantas medicinais do Brasil. Trata-se de um arbusto aromático perene de ramos eretos e sub-lenhosos, que atingem de 1 a 1,5 m de altura. Folhas ovado-oblongas, pilosas e grossas com bordos denteados. Flores de coloração azulada crescem em racemos (espigas) que surgem na estação chuvosa (COSTA; NASCIMENTO, 2003).



Figura 7. Exemplar de *Plectrantus barbatus*.  
Fonte: A autora, 2016.

### 3.3.8 *Schinus terebinthifolius*

*Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha) (Figura 8) é uma espécie nativa da América do Sul, pertencente à família Anacardiaceae. No Brasil, ocorre principalmente de Pernambuco até o Rio Grande do Sul em diversos tipos de formações vegetais. Devido à sua grande dispersão, apresenta diversas aplicações, principalmente pela madeira, na extração de taninos, em paisagismo e uso medicinal. *S. terebinthifolius* é uma das plantas mais conhecidas popularmente no tratamento de inflamações uterinas e na cicatrização de feridas e úlceras e tem sido testada cientificamente sua ação antimicrobiana e antioxidante (SANTOS *et al.*, 2010).

Além destas aplicações, produz, entre outros compostos, flavonóides, taninos e óleos essenciais. De todos os metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais, os alcalóides e os óleos essenciais formam o grupo de compostos com maior número de substâncias biologicamente ativas. Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos ou óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais têm indicado seu potencial no controle de fitopatógenos, assim como atividade fungistática (SIDDIQUI *et al.*, 1996, CUNICO *et al.*, 1999).



Figura 8. Exemplar de *Schinus terebinthifolius*.  
Fonte: A autora, 2016.

### 3.3.9 *Bauhinia forficata*

*Bauhinia forficata* Link (Figura 9), conhecida como Pata de Vaca, pertencente ao gênero *Bauhinia*, família Caesalpinioidea e subfamília, Fabaceae, consiste em uma espécie nativa da América do Sul, distribuindo-se pela Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil; sendo que no Brasil, encontra-se principalmente nas regiões do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (SILVA *et al.*, 2012). A infusão das folhas de *B. forficata* é utilizada na medicina popular brasileira como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (MARTINS *et al.*, 1998).



Figura 9. Exemplar de *Bauhinia forficata*.  
Fonte: A autora, 2016.

### 3.4 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

As culturas exploradas economicamente são infectadas por inúmeros fitopatógenos. Eles causam sérias doenças e, dependendo do patógeno, ocasionam lesões nos órgãos de reserva (frutos, sementes, etc.), no caule, nas raízes, no sistema vascular (xilema), tombam plântulas ou plantas bem desenvolvidas e ainda, dependendo da intensidade da doença, levam as plantas à morte. Essas doenças propiciam queda de produção e, conseqüentemente, prejuízos financeiros para os produtores. Os sintomas comumente causados são: podridão, tombamento de plântulas, podridão de raízes, lesões escuras ou avermelhadas no caule, folhas amareladas e murchas, escurecimento ou avermelhamento do sistema vascular e galhas nas raízes (BUENO; FISCHER, 2006).

#### 3.4.1 *Phyllosticta citricarpa*

A mancha preta dos citros (MPC), causada pelo fungo fitopatogênico *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa, provoca lesões nos frutos de citros ainda em desenvolvimento ou após serem colhidos, 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*) (BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008). Está é uma das mais importantes doenças

que limitam o valor comercial dos frutos colhidos, e também é frequentemente associada a alergias devido a o grande número de esporos que produz e com toxicidade devido à sua produção de micotoxina patulina (MARCEL-HOUBEN *et al.*, 2012). Estes frutos podem enfrentar barreira fitossanitária inviabilizando a exportação *in natura*, assim como são preteridos no mercado interno de frutas frescas, representando uma perda de até um quarto da produção em países em desenvolvimento, devido ao manuseio e condições inadequadas de armazenamento (KIMATI; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2005, DROBY, 2006, LIU *et al.*, 2013).

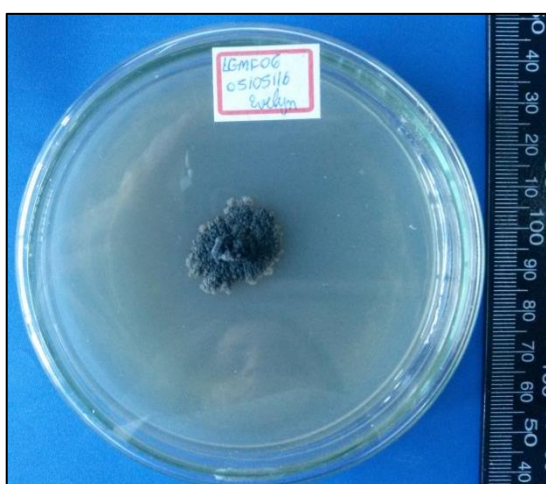


Figura 10. Placa de Petri contendo isolado de *P. citricarpa* inoculado em meio BDA após 30 dias de crescimento.

Fonte: A autora, 2016.

#### 3.4.2 *Colletotrichum graminicola*

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas da agricultura brasileira e mundial, ocupando, no Brasil, uma área agrícola de aproximadamente 56 milhões de hectares, com uma produção anual de 84.660 mil toneladas por ano, sendo o terceiro maior produtor do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e China, que produzem, respectivamente 345.596 e 224.580 mil toneladas ao ano (CONAB, 2016). São muitas as doenças que acometem a cultura do milho, dentre elas a antracnose, causada pelo fungo *C. graminicola* (Ces.) Wils, pode se manifestar em qualquer parte da planta, como raiz, sementes e, principalmente, colmo e folhas. No Brasil, *C. graminicola* está amplamente distribuído nas regiões produtoras de milho (BARBOSA, 2001).

Tem havido dificuldade na obtenção de cultivares com resistência duradoura a alguns patógenos, principalmente ao *C. graminicola*, devido à alta variabilidade apresentada por esse patógeno. Em vista disso, o controle de fitopatógenos por agentes biológicos tornou-se uma alternativa que vem sendo estudada e estimulada, por meio dos conhecimentos obtidos sobre a eficiência de controle de fitopatógenos por microrganismos produtores de compostos de ação antagônica aos patógenos (EMBRAPA, 2003).



Figura 11. Placa de Petri contendo isolado de *C. graminicola* inoculado em meio BDA após 30 dias de crescimento.

### 3.4.3 *Penicillium digitatum*

As perdas econômicas ocasionadas por doenças de pós-colheita representam um dos principais problemas da citricultura brasileira e mundial. Vários fatores relacionados com o fruto, os patógenos, as condições climatológicas e as condições em pós-colheita determinam a incidência e a severidade destas doenças. O bolor verde, causado por *Penicillium digitatum*, é a principal doença em pós-colheita de frutos cítricos em todo o mundo, especialmente em climas quentes (FISCHER; LOURENÇO; AMORIN, 2008).

A infecção pelo patógeno ocorre por meio de ferimentos onde os nutrientes estão disponíveis e estimulam a germinação dos esporos depositados na superfície do fruto (LARANJEIRA *et al.*, 2005). Como forma de controlar esse patógeno, vêm sendo utilizadas práticas culturais visando a reduzir a incidência no campo, o tratamento químico, a irradiação e a termoterapia. Os tratamentos químicos são os mais utilizados, em pré e pós-colheita. Alternativas visando à redução do uso de

fungicidas vêm sendo pesquisadas e com resultados promissores no controle de vários fitopatógenos. Enfoque particular vem sendo dado ao controle biológico e ao uso de extratos de planta, produtos alimentares, aditivos de alimentos, resíduos da produção de alimentos e de conservadores de alimentos no controle de doenças de plantas de forma geral (SHOLBERG; GAUNCE, 1995).



Figura 12. Placa de Petri contendo isolado de *P. digitatum* inoculado em meio BDA após 15 dias de crescimento.

### 3.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Alguns cuidados devem ser tomados para que os fungos endofíticos sejam isolados. A desinfestação superficial da folha é etapa fundamental para o processo de isolamento, para que os fungos epifíticos, que habitam somente a parte externa das folhas não sejam também isolados. Os tempos de tratamento e concentração dos agentes desinfetantes podem variar, dependendo do tipo de material a ser utilizado para tal procedimento, (AZEVEDO, 1998). Temperatura de isolamento, meios de cultura e até o auxílio de substâncias seletivas, como antibióticos, fungicidas ou até outros microrganismos com alguma capacidade de inibição ou de seleção de determinados fungos, são outras variáveis passíveis de serem controladas para uma melhor obtenção dos fungos de interesse (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002, WORAPONG *et al.*, 2002).

### 3.6 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POR SEQUENCIAMENTO DE DNA

A partir de 1970, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, foram gerados muitos dados utilizados para a identificação e filogenia de microrganismos, sendo que alguns grupos foram confirmados e outros redefinidos (ALBERTS *et al.*, 2010). As regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do RNA ribossomal são regiões conservadas do DNA que auxiliam no estabelecimento de relações filogenéticas e distinção de espécies. A identificação de fungos endofíticos tem sido realizada por meio de regiões ITS que possibilitam a identificação de gêneros de fungos isolados de plantas, por meio da amplificação e sequenciamento desses isolados, que são conferidos com um banco de dados, possibilitando futuramente sua utilização em processos biotecnológicos.

Dentre todas as regiões testadas, as regiões ITS1 e ITS2 tem a maior probabilidade de identificação bem sucedida para a mais ampla gama de fungos, mostrando variação inter e intraespecíficas (SCHOCH *et al.*, 2012). O fato desse cluster gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos (FUNGARO, 2000). Desta forma, esta região foi eleita para representar o “DNA barcode” para fungos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ISOLAMENTO

Foram realizados experimentos de isolamento fúngico, utilizando folhas de *Citrus sinensis*, *Citrus bigaradia* e *Citrus limettioides*, coletadas na localidade 25°26'25.168"S 49°17'47.385"O, em Curitiba-PR, bairro Batel, *Alternanthera brasiliana* coletada na localidade 25°27'4.504"S 49°17'22.001"O, em Curitiba-PR, bairro Rebouças, *Mentha* sp. e *Maytenus ilicifolia* coletadas na localidade 25°52'26.151"S 49°29'52.101"O, em Quitandinha-PR, bairro Anta Magra, *Coffea* sp., *Ginkgo biloba*, *Plectranthus barbatus*, *Schinus terebinthifolius* e *Bauhinia forficata* coletas na localidade 25°26'52.64"S 49°14'00.38"O, em Curitiba-PR, no Centro Politécnico da UFPR, bairro Jardim das Américas.

Em média, dez folhas por espécies vegetal foram desinfestadas superficialmente com água e sabão neutro sob água corrente, depois imergidas em álcool 70% por 1 minuto, por tempos variados entre 30 segundos e três minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) 2%, de acordo a espessura da folha, conforme Quadro 1, novamente em álcool 70% por 30 segundos, e em água destilada por dois tempos de 6 minutos (adaptado de PETRINI *et al.*, 1991).

Planta hospedeira (Nome científico)	Tempo em NaClO	Nº de folhas utilizadas
<i>Citrus sinensis</i>	3 min	11
<i>Citrus limettioides</i>	1 min; 1 min e 30 seg*	11
<i>Citrus bigaradia</i>	3 min	6
<i>Coffea</i> sp.	30 seg; 1 min*	14
<i>Maytenus ilicifolia</i>	3 min	9
<i>Alternanthera brasiliana</i>	45 seg	6
<i>Mentha</i> sp.	1 min	9
<i>Ginkgo biloba</i>	1 min	5
<i>Plectranthus barbatus</i>	1 min	5
<i>Schinus terebinthifolius</i>	3 min	10
<i>Bauhinia forficata</i>	1 min	5

Quadro 1. Tempo de desinfestação e número de folhas utilizadas no isolamento. \*Quando não houve crescimento de fungos no isolamento o experimento foi repetido reduzindo-se o tempo de exposição ao NaClO.

Fonte: A autora, 2016.

Após a desinfestação, as folhas foram fragmentadas em pedaços de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>, e dispostas em placas de Petri com meio batata-dextrose-água (BDA) comercial, marca Sigma, previamente inoculadas com *Muscodor* sp.,

isolado LGMF1254, cinco dias antes, tendo em vista que os fungos do gênero *Muscodor* não são inibidores de fungos do mesmo gênero, conforme protocolo adaptado de Worapong *et al.* (2002) e Zhang *et al.* (2010). Para auxiliar na identificação dos isolados, cada fragmento de folha depositado recebeu uma numeração de F1 a F4, de acordo com sua posição sobre a placa (Figura 13). De cada espécie vegetal foram preparadas de 9 a 12 placas que foram vedadas com fita adesiva, incubadas a  $25\pm 2$  °C e avaliadas visualmente todos os dias durante 15 dias.

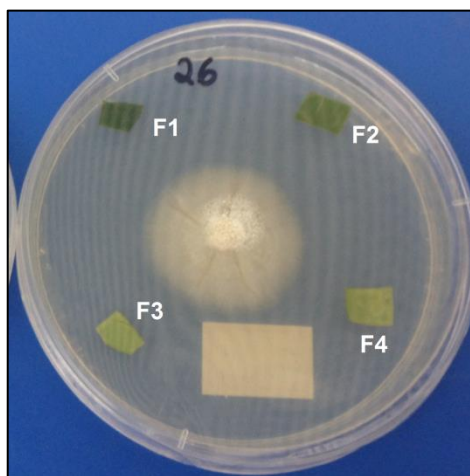


Figura 13. Montagem do isolamento com o inóculo de *Muscodor* sp. LGMF1254 e fragmentos de amostras vegetais identificadas com o nº dos fragmentos das folhas.  
Fonte: A autora.

Dentre os fungos que cresceram aqueles que possuíam morfologia com alguma semelhança visual a outros do gênero *Muscodor*, foram repicados em novas placas com BDA, com repique único central.

#### 4.2 TESTES DE ANTAGONISMO

A atividade antifúngica produzida pelos isolados foi testada utilizando método de bioensaio adaptado de Ezra, Hess e Strobel (2004). Foram inoculados, em placas de Petri com BDA, um disco de micélio cortado com 5 mm de diâmetro dos isolados obtidos e incubados a  $25\pm 2$  °C durante 5 dias para crescimento e produção de compostos orgânicos voláteis. Após esse período, os fitopatógenos foram inoculados. Um disco de micélio de 5 mm de diâmetro de *C. graminicola* e *P. citricarpa*, e um pequeno fragmento de micélio inoculado com palito para *P. digitatum* a 5 cm de distância do fungo a ser testado. Como controle, as placas

foram inoculadas somente com os fitopatógenos desprovidas dos isolados a serem testados, permitindo que as colônias cresçam normalmente (Figura 14). As placas foram incubadas a  $25\pm 2$  °C para *P. citricarpa* e *P. digitatum* e a  $22\pm 1$  °C para *C. graminicola*. As placas foram avaliadas a cada dois dias, durante 10 dias para *C. graminicola* e *P. digitatum*, e após 7, 14 e 21 dias para *P. citricarpa*. A ação de inibição foi determinada por medição da diferença na área do crescimento de microrganismos em teste e placas de controle com auxílio do programa ImageJ v1.50i e a análise estatística dos dados obtidos foi realizada por meio do programa Assistat v7.7 pelo teste de Tukey ou Kruskal-Wallis, quando não foi possível determinar a normalidade dos dados.

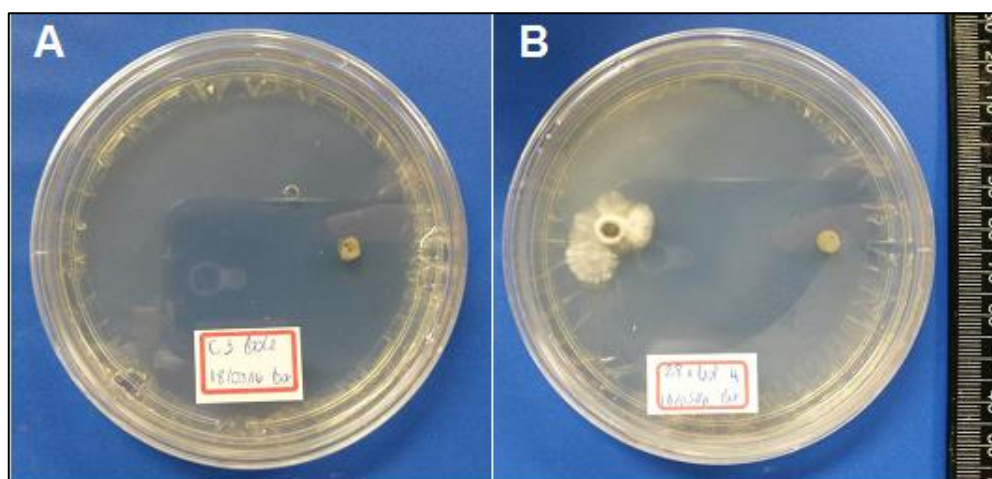


Figura 14. Foto esquemática do experimento de antagonismo. A: Controle, com apenas o patógeno inoculado. B: A esquerda o isolado a ser testado com 5 dias de crescimento prévio e a direita o inóculo do patógeno.

Fonte: A autora, 2016.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

Foi realizada caracterização morfológica dos isolados obtidos por meio de inspeção visual das placas de cultivo e preparo de lâminas histológicas por raspagem do micélio coradas com azul de algodão e observadas por microscopia de luz.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS

Está sendo realizado o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos isolados que obtiveram os melhores resultados no teste de antagonismo, a fim de identificar os mesmos em nível de gênero.

##### 4.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por fenol, conforme protocolo adaptado de Raeder e Broda, (1985). Foram inoculados seis fragmentos de micélio em placas de Petri contendo BDA coberto por celofane. Após três de crescimento em temperatura de  $25\pm 2$  °C, o micélio foi raspado e acondicionado em tubos *Eppendorf*. Aos tubos contendo micélio, foram acrescidos 2000  $\mu$ L de Tampão de Extração agitado no vórtex horizontalmente por cinco minutos. Em seguida, os tubos foram incubados por 20 minutos em banho-maria a 60 °C e incubado no gelo por dez minutos. Depois, foram transferidos para outro *Eppendorf* 900  $\mu$ L do sobrenadante e adicionados 900  $\mu$ L de Clorofane e centrifugado a 10.000g. Com a separação em duas fases, foram transferidos 800  $\mu$ L da fase superior para outro tubo, e foi adicionado o mesmo volume de Clorofil e agitado por cinco minutos a 10.000g. Então foram transferidos 650  $\mu$ L da fase superior para outro tubo, acréscimo de dois volumes de etanol (1300  $\mu$ L) e centrifugado por 20 minutos a 10.000g. Foi vertida a fase aquosa e adicionado 500  $\mu$ L de etanol 70% e centrifugado por dez minutos a 12.000g. Verteu-se novamente a fase aquosa, deixando-se secar *overnight* em temperatura ambiente. Aplicou-se 0,5  $\mu$ L de RNase [20mg/mL] e 50  $\mu$ L de Tris-Cl pH de 7, [610mM], agitando-se manualmente e foi ressuspensão por uma hora.

As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (TRIS-acetato 40mM e EDTA 1Mm, pH 8,3), aplicando-se 2  $\mu$ L da amostra, 1  $\mu$ L de tampão e 5  $\mu$ L de marcador Hind III em poços no gel e submetidas a 100 V por 90 minutos. Após o término da corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em um transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA-USA).

#### 4.4.2 Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA

Os iniciadores utilizados para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 dos isolados serão ITS-1 e ITS-4 (WHITE; MARROW, 1990). A amplificação foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) com um volume final de 12,5 µL solução, em água Mili-Q contendo 1,25 µL de tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de uma mistura de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 10 ng de DNA extraído e 1,25 U de Taq DNA polimerase. A amplificação para a região IT1-5,8S-ITS2 do rDNA foi realizada com desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55°C e 1 minutos a 72 °C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72 °C.

As amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (TRIS-acetato 40mM e EDTA 1Mm, pH 8,3), aplicando-se 2 µL da amostra, 1 µL de tampão e 5 µL de marcador de peso molecular Kasvi 1kb (1000bp) em poços no gel e submetidas a 100 V por 90 minutos. Após o término da corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em um transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA-USA).

Para a purificação das PCRs, foram utilizadas as enzimas Exo 1 e Fast AP. Para cada solução foram acrescentados ao produto da PCR 0,34 µL de água Mili-Q e 0,33 µL de cada enzima. Para a finalização da purificação as soluções foram colocadas no termociclador em um ciclo de 37 °C por 1 hora e 85 °C por 15 minutos.

Para quantificar o DNA obtido, usou-se um espectrofotômetro (NanoDrop®ND-1000 UV-Vis). Quando o NanoDrop mede a absorvância a 260nm obtêm-se um valor, que multiplicado por 50 indica a concentração de DNA na amostra, em ng/µL.

As amostras foram acondicionadas em tubos de 0,5 ml, 60 ng de DNA, 4,5 pmol de *primer* e água Mili-Q até o volume de 6 µl. As amostras foram secas deixando o tubo aberto em estufa a 56±2 °C durante 60 minutos. As amostras foram enviadas a empresa Ludwig Biotecnologia para realização do sequenciamento utilizando o equipamento *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) em 01/06/2016 e aguarda resultado.

A edição e o alinhamento das sequências obtidas serão realizados com o programa BioEdit v7.2.5 e MEGA. As sequências serão confrontadas com as sequências do banco de dados do *GenBank* utilizando o programa BLAST.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 BIOPROSPECÇÃO

Todas as espécies vegetais avaliadas apresentaram crescimento fúngico, e dentre eles 43 apresentaram semelhanças ao crescimento inicial de *Muscodor* e foram isolados. Nove destes continuaram apresentando semelhanças morfológicas por inspeção visual com fungos do gênero *Muscodor* ao longo de seu crescimento, tendo como comparação os três depositados na coleção do LabGeM. Esses foram nomeados provisoriamente de acordo com o número da placa e do fragmento de folha da qual foram isolados (Quadro 2) e foram analisados quando ao seu potencial antagonista de fungos fitopatogênicos.

Planta hospedeira (Nome científico)	N.º de folhas utilizadas	N.º de isolados obtidos	N.º de isolados com morfologia semelhante a <i>Muscodor</i>	Código provisório dos isolados
<i>Citrus sinensis</i>	11	4	0	
<i>Citrus limettioides</i>	11	3	2	28F2 e 135F2
<i>Citrus bigaradia</i>	6	2	0	
<i>Coffea</i> sp.	14	3	2	1106F1 e 107F2
<i>Maytenus ilicifolia</i>	9	3	0	
<i>Alternanthera brasiliana</i>	6	11	5	16F2, 33F4, 36F3, 38F1 e 38F4
<i>Mentha</i> sp.	9	0	0	
<i>Ginkgo biloba</i>	5	3	0	
<i>Plectranthus barbatus</i>	5	5	0	
<i>Schinus terebinthifolius</i>	10	5	0	
<i>Bauhinia forficata</i>	5	4	0	

Quadro 2. Relação de isolados obtidos por espécie vegetal e número de isolados com ação antagonista.

### 5.2 ANTAGONISMO

Nos testes de antagonismo realizados, os isolados 33F4 e 107F2, obtidos, respectivamente, de *A. brasiliana* e *Coffea* sp., apresentaram os melhores resultados contra o fitopatógeno *P. digitatum*, demonstrando uma redução significativa no crescimento do patógeno de 73,71% e 34,89%, respectivamente, aos 6 dias de tratamento (Figura 15) e 82,51% e 75,8%, respectivamente, no final do tratamento aos 10 dias. Os isolados 28F2, 38F1, 38F4 e 106F1 também apresentaram efeito de redução no crescimento do patógeno, porém esta não foi estatisticamente significativa. Os resultados obtidos nos primeiros seis dias foram

avaliados pela análise da variância (Anova) pelo Teste de Tukey, (Apêndice 1) e aos dez dias de experimento foi realizado o teste de Kruskal Wallis, pois não foi possível atestar a normalidade dos dados (Apêndice 2).

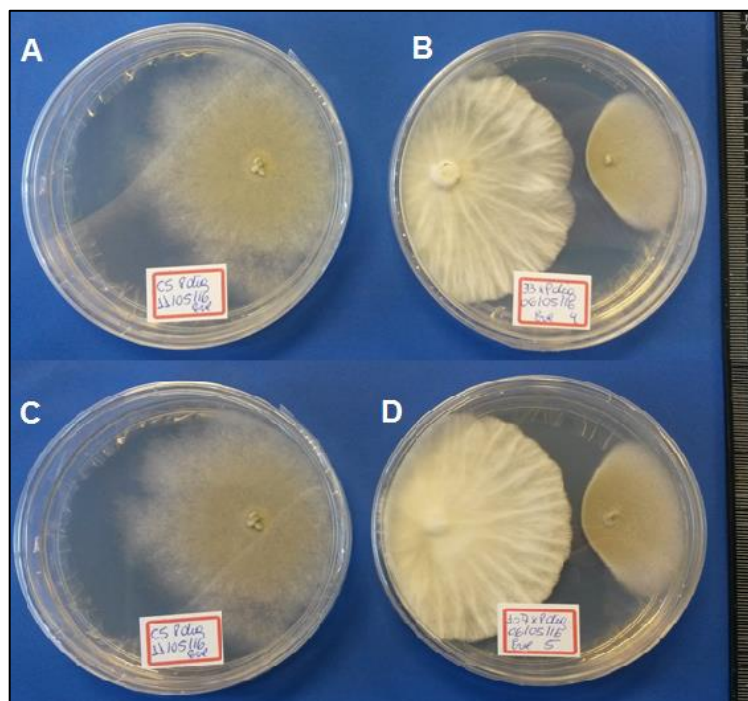


Figura 15. Teste de antagonismo contra o fungo *P. digitatum* após 6 dias de tratamento. A e C: Controle. B: A esquerda inóculo do isolado 33F3 e a direita inóculo de *P. digitatum*. D: A esquerda inóculo do isolado 107F2 e a direita inóculo de *P. digitatum*. Fonte: A autora.

Os isolados 28F2 e 106F1, obtidos, respectivamente, de *C. limettioides* e *Coffea* sp. apresentaram os melhores desempenhos contra *C. graminicola*, inibindo seu crescimento em 56,18% e 47,36%, respectivamente, aos 6 dias (Figura 16) e 71,56% e 68,98% ao final do período de 10 dias, respectivamente. Os demais isolados 33F3, 38F1, 38F4 e 107F2, também demonstraram alguma redução no crescimento do patógeno, porém este não foi estatisticamente significativo. No entanto, não foram observadas visualmente alterações na produção de esporos tanto nos tratamentos quanto no controle. Os resultados obtidos nos primeiros dois dias foram avaliados pela análise da variância (Anova) pelo Teste de Tukey, (Apêndice 3) e aos dez dias de experimento foi realizado o teste de Kruskal Wallis, pois não foi possível atestar a normalidade dos dados (Apêndice 4).

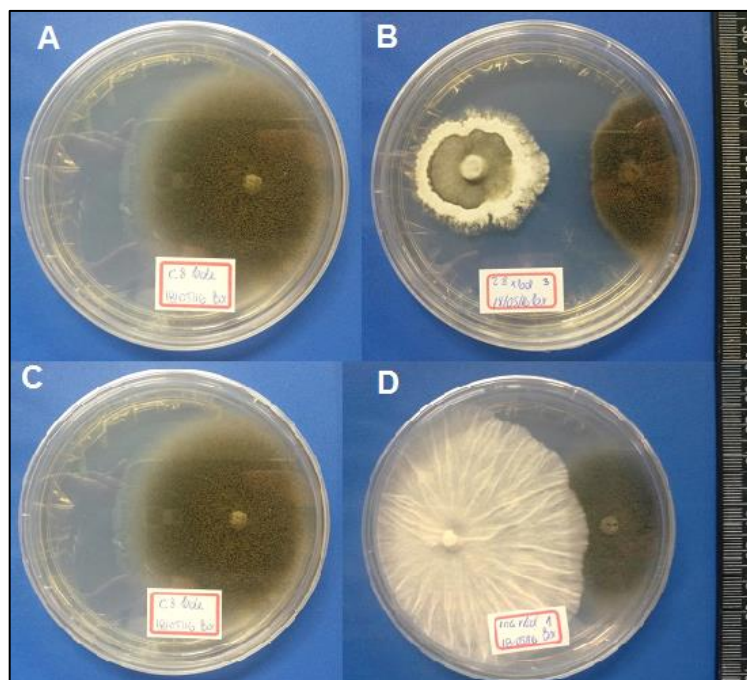


Figura 16. Inibição do crescimento de *C. graminicola* após 6 dias de tratamento. A e C: Controle. B: A esquerda inóculo do isolado 28F2 e a direita o inóculo de *C. graminicola*. D: A esquerda inóculo do isolado 106F1 a direita o inóculo de *C. graminicola*.

Para ambos os fitopatógenos não foi possível mensurar o potencial antagonista dos isolados 16F3 e 36F3 devido à contaminação do experimento, e por isto foram deixados para estudos posteriores.

Para *P. citricarpa* não foi possível realizar a análise estatística dos dados, no entanto, é possível notar diferenças visuais no tamanho das colônias formadas pelo patógeno no controle e nos tratamentos (Figura 17), apesar do fungo testado ter sobreposto a colônia de *P. citricarpa*, o que indica uma possível ação antagonista sobre o fitopatógeno, conforme já relatado por Polonio (2016), porém mais testes e a repetição do experimento devem ser realizados modificando a metodologia, inoculando o fungo testado e o patógeno no mesmo dia, ou utilizando-se placas com divisórias, em função da diferença de velocidade de crescimento entre eles, evitando a sobreposição das colônias formadas.

Não foi possível testar o isolado 135F2, pois o mesmo havia sido obtido somente no último experimento de isolamento realizado, e não havia crescido o suficiente até a data da montagem dos experimentos de antagonismo.

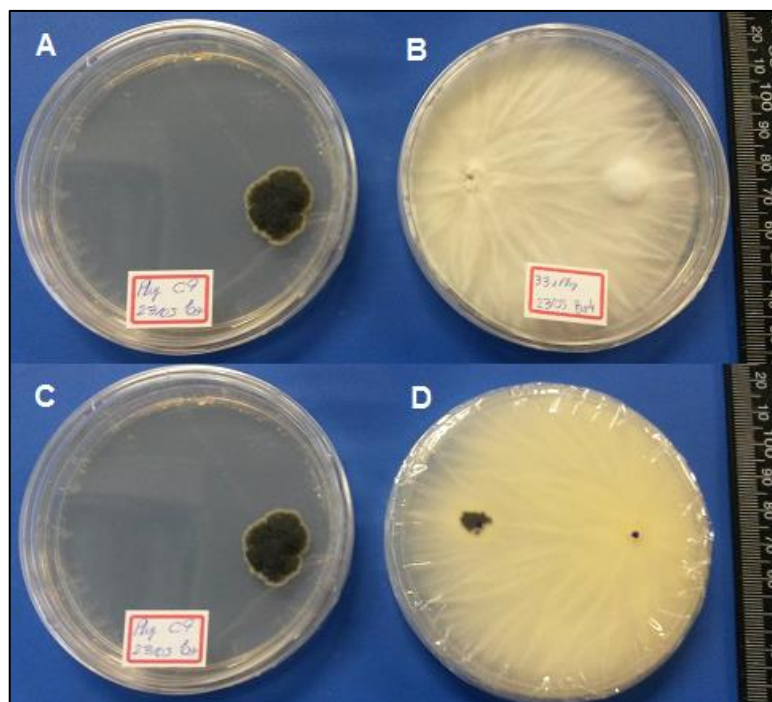


Figura 17. Inibição do crescimento de *P. citricarpa* após 14 dias de tratamento. A e C: Controle. B: A esquerda inóculo do isolado 33F3 e a direita o inóculo de *P. citricarpa*. D: Verso da imagem B em detalhe a esquerda o inóculo de *P. citricarpa*.

Fonte: A autora, 2016.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Ao observar os isolados de *Muscodor* sp., depositados na coleção do LabGeM, LGMF1254, LGMF1255 e LGMF1256 (Figura 18), verifica-se que os mesmos apresentam crescimento micelial formado por hifas brancas, não septadas e ramificadas, bastante emaranhadas, sem uma organização específica, e ausência de estruturas produtoras de esporos, conforme já descrito na literatura para as demais espécies já descritas de *Muscodor*. Nota-se diferenças quanto à densidade do micélio, sendo o isolado LGMF1254 formado por hifas mais compactas, enquanto LGMF1255 e LGMF1256 apresentam hifas menos entrelaçadas. Quanto a macromorfologia, apresentam crescimento uniforme, colônia membranosa, ligeiramente translúcida e formam ranhuras radiais no meio de cultivo.

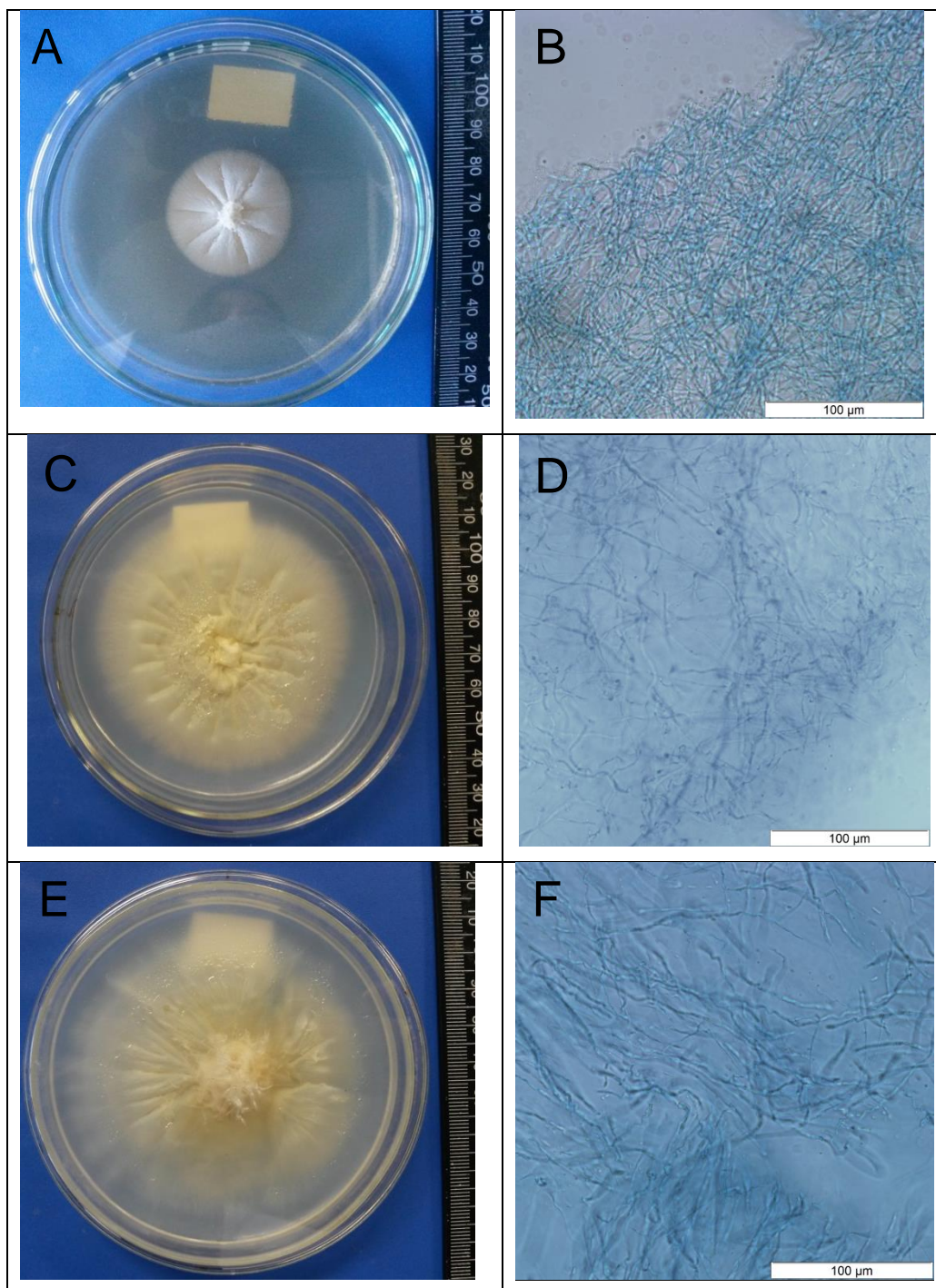


Figura 18. Morfologia dos isolados depositados na coleção do LabGeM. A esquerda: Visão geral da placa. A direita: Microscopia ótica em aumento de 400x. A e B: LGMF1254. C e D: LGMF1255. E e F LGMF1256.

Ao comparar a morfologia dos isolados que obtiveram os melhores resultados nos testes de antagonismo (Figura 19) com os isolados de *Muscodor*, estes também não apresentam formação de esporos, sendo o isolado 106F1 o que apresenta um micélio mais denso, assim como LGFM1254, os demais apresentam

hifas menos compactadas. Quanto a sua macromorfologia, estes apresentam textura algodoadosa, pouco aderida ao meio de cultura. Com crescimento radial e uniforme.

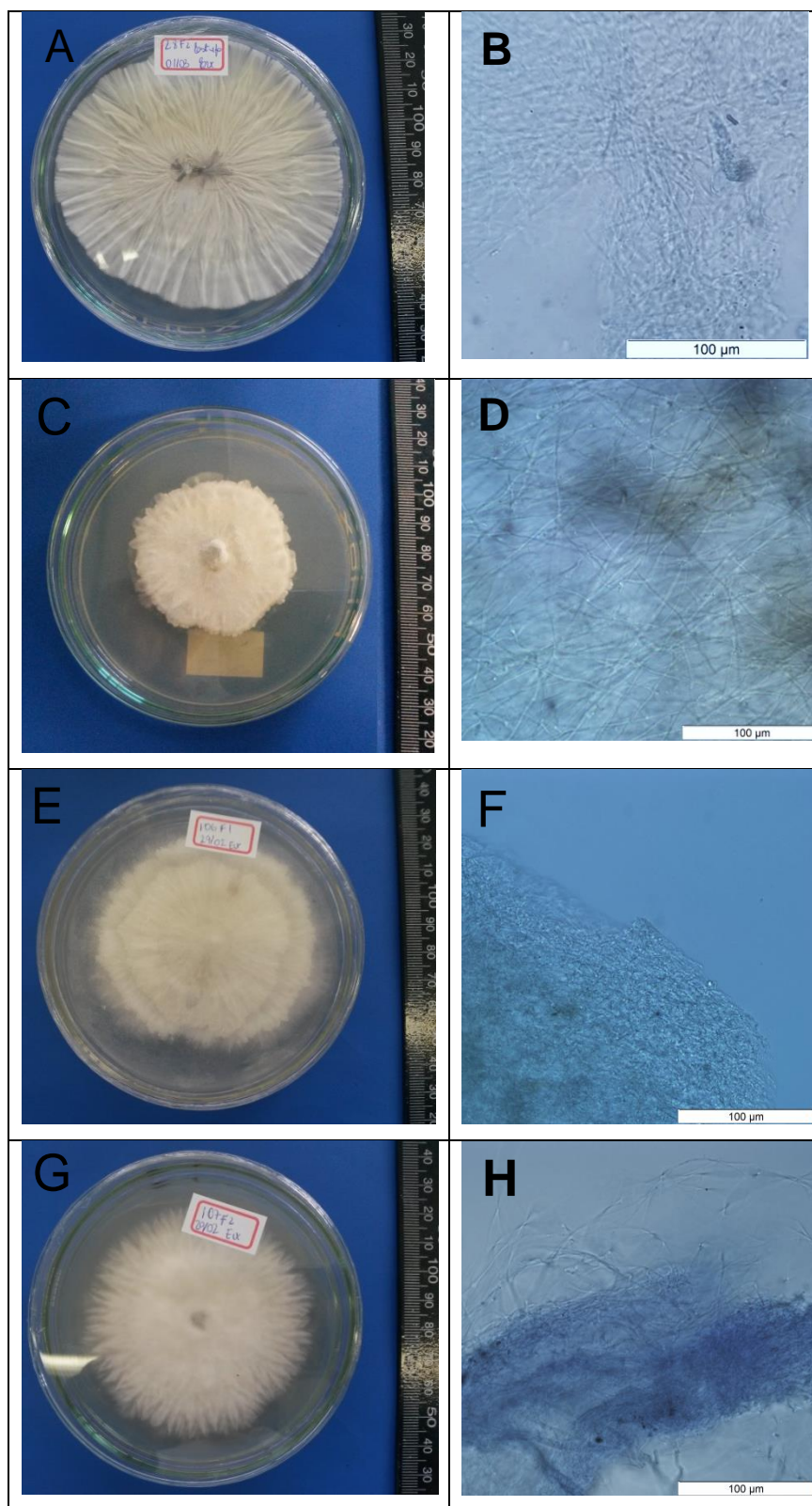


Figura 19. Morfologia do isolados que apresentaram os melhores resultados nos testes de antagonismo. A esquerda: Visão geral da placa. A direita: Microscopia ótica em aumento de 400X. A e B: Isolado 28F2. C e D: Isolado 33F4. E e F: Isolado 106F1. G e H: Isolado 107F2.

Quanto ao isolado 135F2 (Figura 20), não foi possível testar seu desempenho quanto à inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos, no entanto este destaca-se por ser o que apresentou a macromorfologia mais semelhante aos isolados conhecidos de *Muscodor*, colônia de cor branca, ligeiramente translúcida, membranosa e forma ranhuras no meio de cultivo (Figura 20A). Também apresentou crescimento em forma de emaranhado de hifas, porém estas parecem ser mais finas e enoveladas que o observado nos demais (Figura 20B) e ausência de estruturas reprodutivas.

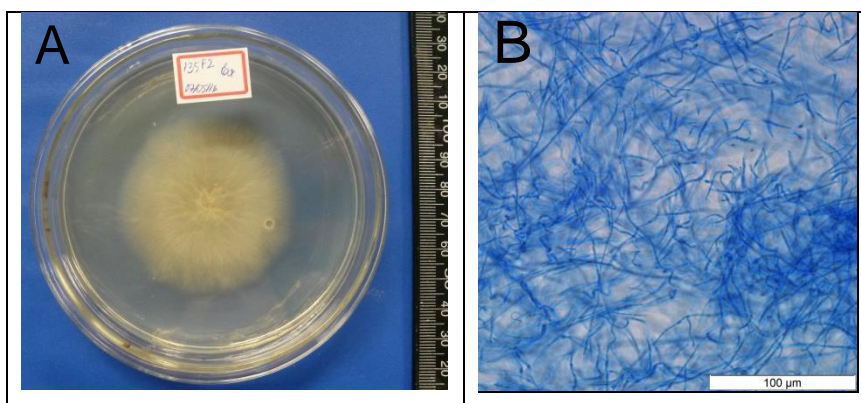


Figura 20. Morfologia do isolado 135F2. A esquerda: Visão geral da placa. A direita: Microscopia ótica em aumento de 400x.

Os demais isolados, 16F3, 36F3, 38F1 e 38F4 (Figura 21), apresentaram colônias algodinosas, crescimento radial, hifas emaranhas de cor branca e ausência de estruturas produtoras de esporos.

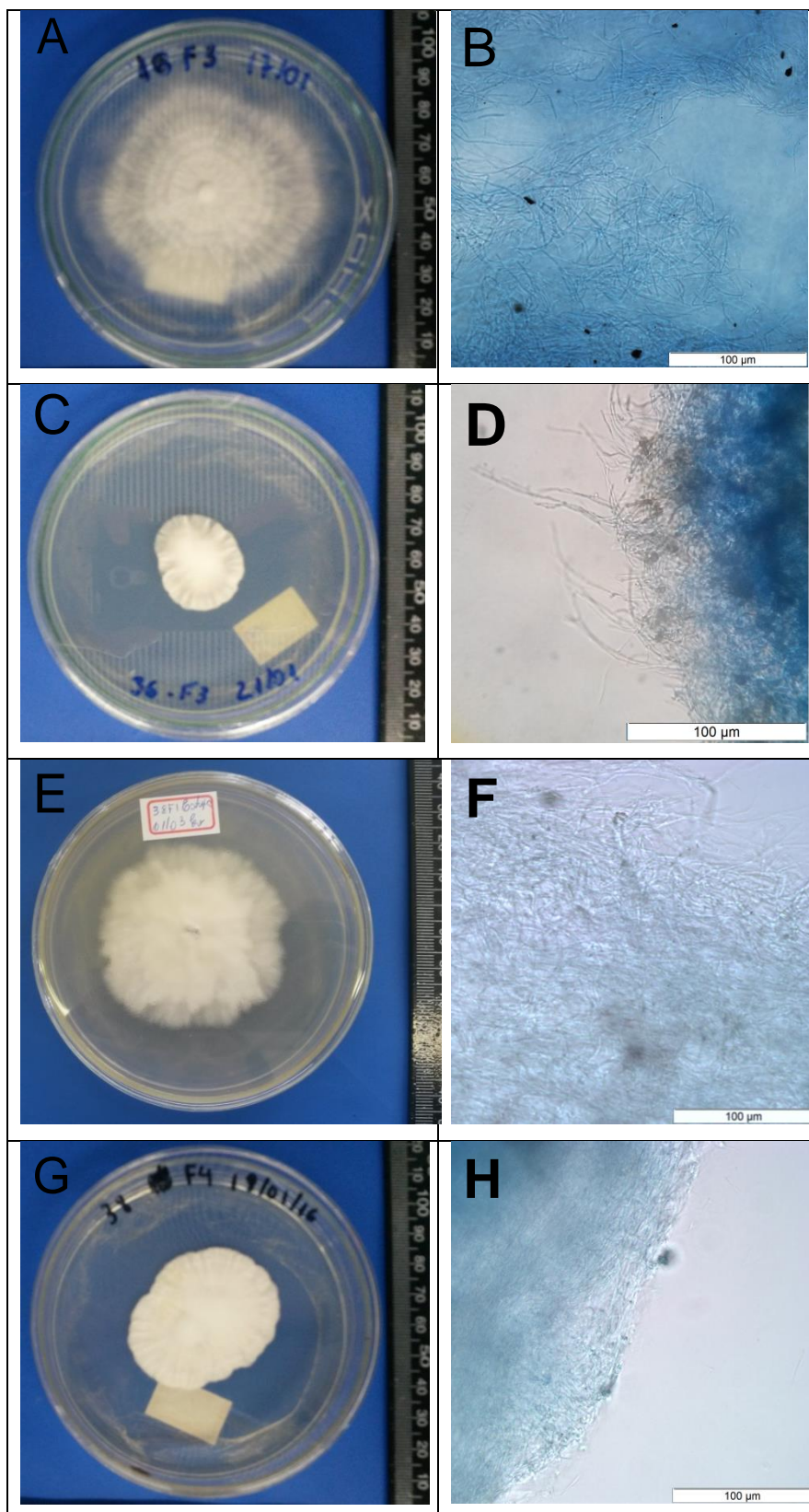


Figura 21. Morfologia dos demais isolados testados. A esquerda: Visão geral da placa. A direita: Microscopia ótica em aumento de 400X. A e B: Isolado 16F3. C e D: Isolado 36F3. E e F: Isolado 38F1. G e H: Isolado 38F4.

Os isolados obtidos inicialmente apresentaram morfologia semelhante ao descrito para o gênero *Muscodor* e foram selecionados para os testes de antagonismo. Porém, após um período prolongado de crescimento, acima de 30 dias, alguns destes fungos começaram a apresentar uma morfologia bastante distinta da inicial e, portanto, diferente da morfologia observada nos isolados de *Muscodor* sp.

Nesses isolados foi observada apresentação de pigmentos negros no verso das placas de 33F4, acinzentados na frente da placa de 28F2 e 36F3 e castanhos no verso das placas de 16F3, 28F2 e 36F3 (Figura 22) e crescimento vertical dentro das placas de cultivo para os isolados 16F3 e 28F2 (Figura 23), tendo estas estruturas sido avaliadas por microscopia de luz, não foi observada produção de esporos pelas mesmas até o momento.

Essas características observadas são bastante distintas daquelas descritas para *Muscodor*, no entanto, ainda que estes possam não pertencer a este gênero, o que ainda deverá ser confirmado por meio de sequenciamento, sabe-se que outros fungos produtores de compostos de interesse biotecnológicos podem ser resistentes a presença de *Muscodor*, como relatado por Singh *et al.* (2011) para o fungo *Phomopsis* sp., que apresenta uma ação antagonista a uma grande variedade de fungos fitopatogênicos, tais como *Colletotrichum lagenarium*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

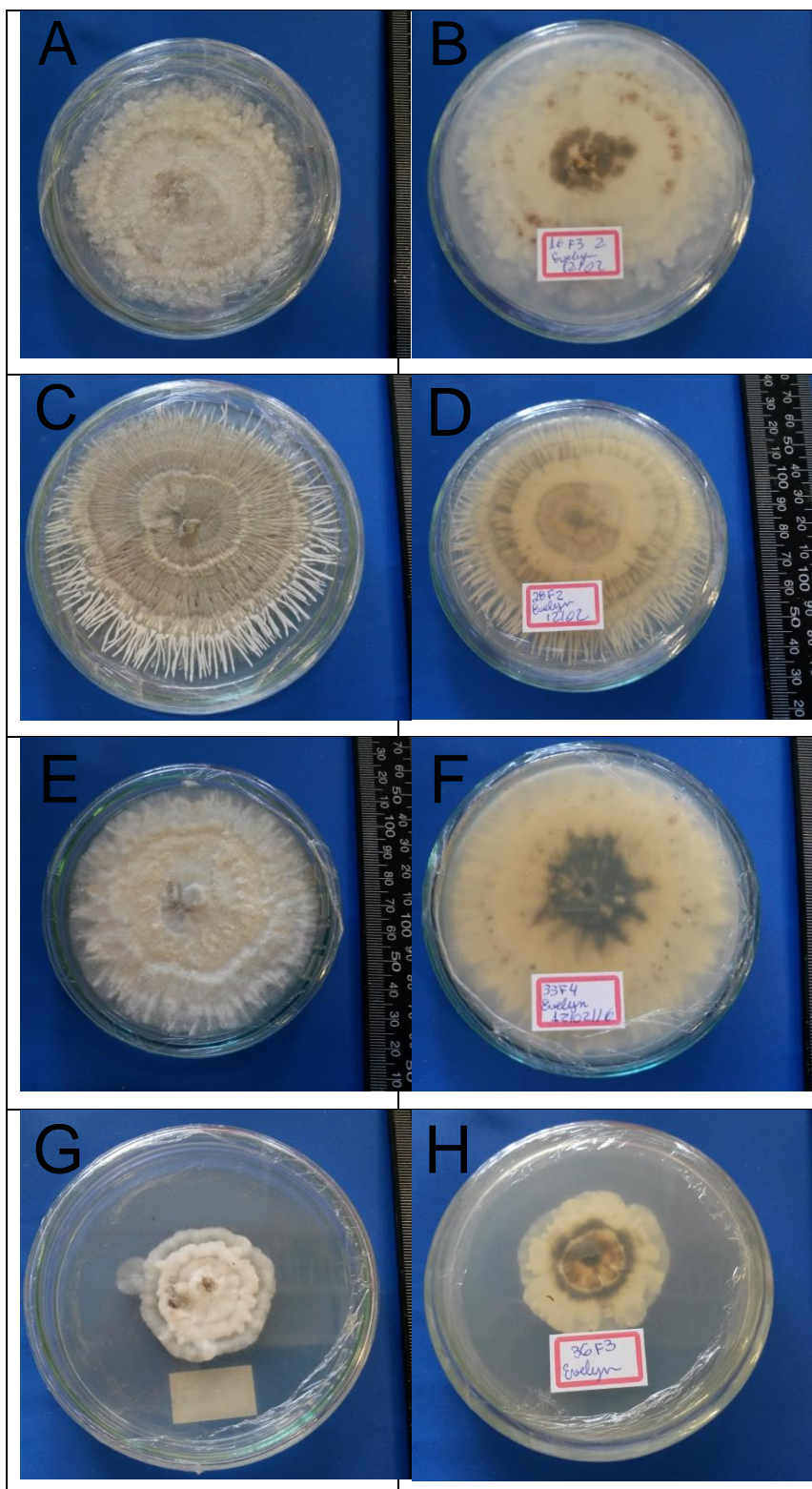


Figura 22. Diferenças morfológicas observadas nos isolados. A esquerda, frente das placas. A direita verso das placas. A e B: 16F3. C e D: 28F2. E e F: 33F4. G e H: 36F3.

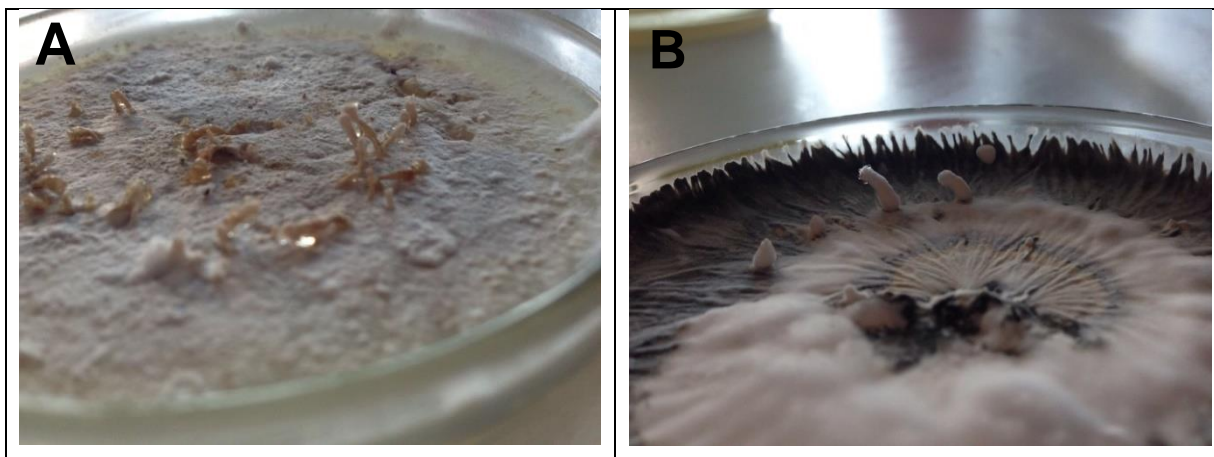


Figura 23. Detalhe das estruturas de crescimento vertical observadas nas placas de cultivo. A: 16F3. B: 28F2.

#### 5.4 ANÁLISES MOLECULARES

A quantificação de DNA após a extração de DNA dos isolados 28F2, 33F4, 107F2, 36F3, 38F4, 106F1, 135F2 e 38F1 foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Figura 24) e mensurada visualmente a quantidade de DNA obtida, apresentando um alto volume de DNA para o isolado 33F4, intermediário para os isolados 107F2, 135F2 e 38F1, e baixo volume para os isolados 28F2, 36F3, 38F4 e 106F1, mas ainda possível de realização a amplificação da região ITS, sendo a amostra obtida do isolado 33F4 diluída na proporção 1:4 para a realização da PCR.

Não foi possível realizar a extração de DNA para o isolado 16F2, pois o mesmo não apresentou crescimento mínimo necessário, inviabilizando a aplicação do protocolo.

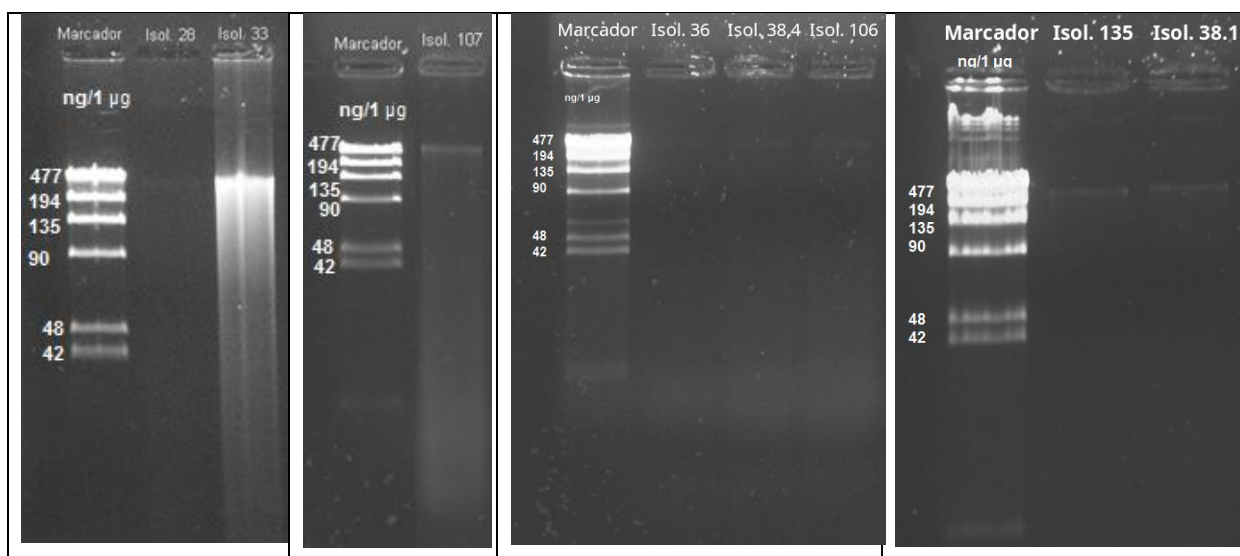


Figura 24. Géis de extração de DNA dos isolados 28F2, 33F4, 107F2, 36F3, 38F4, 106F1, 135F2 e 38F1 com uma banda visível entre as faixas de 477 e 194 ng/1 µg.

De acordo com o observado nos géis de PCR da amplificação da região ITS 1-5.8S ITS2, foram obtidos fragmentos com tamanhos próximos a 600 pares de bases para todos os isolados, tamanho este dentro do esperado para a região utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4.

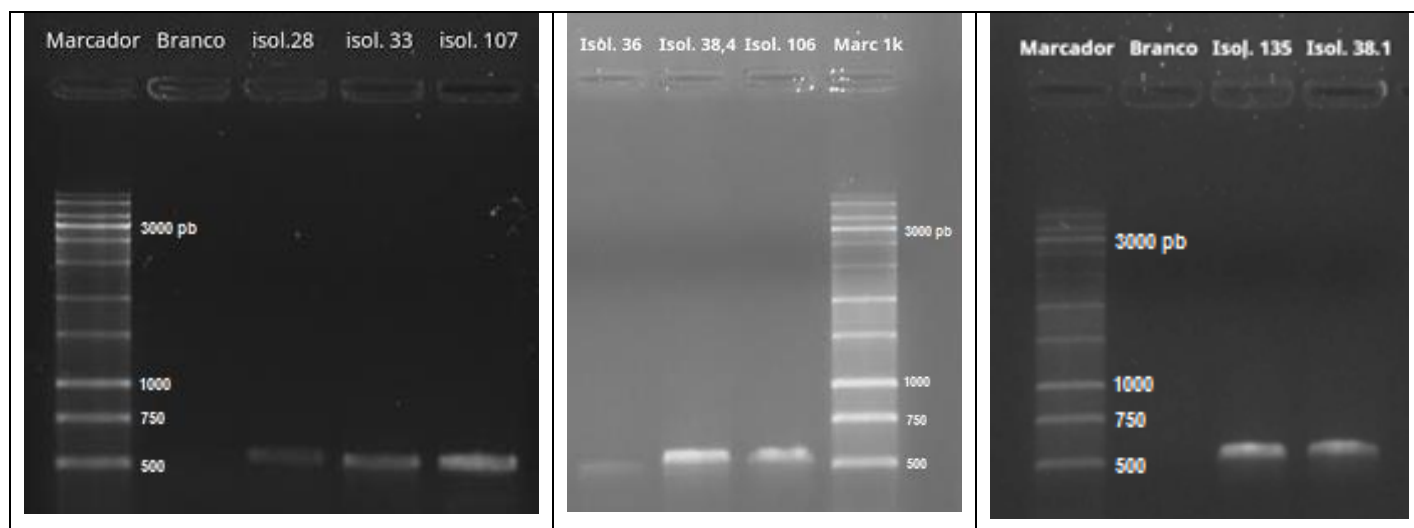


Figura 25. Eletroforese da região ITS amplificada dos isolados 28F2, 33F4, 107F2, 36F3, 38F4, 106F1, 135F2 e 38F1 apresentando aproximadamente 600 pares de base, comparados ao marcador de 1kb.

A quantidade de DNA obtida após a purificação da PCR foi confirmada por meio de verificação em NanoDrop, sendo constatados 383,6 ng/μL para 28F2, 336,7 ng/μL para 33F4, 382,9 ng/μL para 107F2, 440,1 ng/μL para 36F3, 465 ng/μL para 38F1, 408,7 ng/μL para 38F4, 487,2 ng/μL para 106F1, 383,9 para 135F2.

Com base nos resultados do teste de antagonismo e na caracterização morfológica, foram selecionados para realizar o sequenciamento os isolados 33F4, 107F2 e 135F2, no entanto, ainda não foram recebidos os resultados do sequenciamento.

## CONCLUSÕES

Todas as espécies vegetais utilizadas apresentaram crescimento de fungos endofíticos

Somente nove fungos obtidos apresentaram morfologia semelhante àqueles pertencentes ao gênero *Muscodor*.

As espécies vegetais *Anternathera brasiliiana*, *Coffea* sp. e *Citrus limettioides* apresentam fungos endofíticos com potencial no controle biológico dos fungos fitopatogênicos *Penicillium digitatum* e *Colletotrichum graminicola*.

Apenas com o sequenciamento da região ITS será possível confirmar a identidade dos isolados promissores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC: Associação Brasileira da Indústria de Café. **História**. 2016 Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38&inford=57#57>> Acesso em: 01/06/2016.
- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 5ª ed. New York: Garland, 2010.
- AZEVEDO, J. L. Fungos – Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 1, Ano 1, 1997.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariuna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do sul: EducS, 638 p, 2010.
- 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**, n. 120, p. 103-110, 2008.
- BANERJEE, D.; PANDEY, A.; JANA, M.; STROBEL, G. *Muscodora albus* MOW12 an Endophyte of *Piper nigrum* L. (Piperaceae) Collected from North East India Produces Volatile Antimicrobials. **Indian J Microbiol**, v. 54, n. 1, p. 27-32, 2013.
- BARBOSA, M. P. M. **Variabilidade Patogênica de *Colletotrichum Graminicola* Isolado de Milho (*Zea Mays* L.)**. 112f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Leipzig: Engelmann, 1866, 316p.
- BITENCOURT, J.; MAYER, J. L. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação vegetativa de *Ginkgo biloba* por alporquia. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 71-74, 2007.
- BORGES, M. S. **Estudo da produção metabólica de *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae)**. 111f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.
- BRENT, K. J.; HOLLOWAY, D. W. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?** 56f. FRAC Monograph No. 1 (second, revised edition). Brussels: Published by Global Crop Protection Federation. 2007.
- BUENO, C. J.; FISCHER, I. H. Manejo De Fungos Fitopatogênicos Habitantes do Solo. **Apta Regional**, v. 3, n. 2, 2006.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Monitoramento agrícola – safra 2015/16**, v. 3, n. 7, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_07\\_10\\_39\\_11\\_boletim\\_graos\\_abril\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_07_10_39_11_boletim_graos_abril_2016.pdf)>. Acesso em: 01/06/2016.

COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S. C. Atividade Citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 155-158, 2003.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 47-59, 2012.

CHOWDHARY, K.; KAUSHIK, N.; COLOMA, A. G.; CABRERA, M. R. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 467-485, 2012.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; CARVALHO, J. L. S.; PEITZ C.; STAMGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotechnol Cien Desenvol**, v. 11, p. 16-21, 1999.

DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D. K.; RUNYON, J. B. Naphthalene, and insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, n. 148, p. 3737-3741, 2002.

DROBY, S. Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. **Acta Horticulturae**, n. 709, p. 45-51, 2006.

EMBRAPA, **Controle Biológico de raças e isolados de Colletotrichum graminicola, do sorgo, por Actinomicetos**. Comunicado Técnico, n. 62. Sete Lagoas – MG, 2003. Disponível em: <[http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/16143/1/Com\\_62.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/16143/1/Com_62.pdf)>. Acesso em: 01/06/2016.

EZRA, D.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile - antibiotic-producing fungus. **Microbiology**, n. 12, p. 4023–4031, 2004.

FAO, 2016. **Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA&subject=4>>. Acesso em: 01/05/2016.

FERREIRA, E. A.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, E. A. M.; SILVA, A. A.; RUFINO, R. J. N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil: IV - *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 263-271, 2003.

FISCHER, I. H.; LOURENCO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 219-226, 2008.

FONSECA, Z. A. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. – LARANJEIRA. **Plantamed**, 2016. Disponível em: <[http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Citrus\\_sinensis.htm](http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Citrus_sinensis.htm)>. Acesso em: 01/06/2016.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.14, p. 12-16, 2000.

GONZÁLEZ, M. C, ANAYA, A. L.; GLENN, A. E., MARCIAS-RUBAICAVA.M.L., HERNANDEZ-BAUTISTA, B., HANLIN, R. T. *Muscodor yucatanensis*, new endophytic acomycete from Mexican chakah, bursera simaruba. **Mycotaxon**, v. 110, p. 363-372, 2009.

GRIMME, E.; ZIDACK, N. K.; SIKORA, R. A.; STROBEL, G. A.; JACOBSEN, B. J. Comparison of *Muscodor albus* Volatiles with a Biorational Mixture for Control of Seedling Diseases of Sugar Beet and Root-Knot Nematode on Tomato. **Plant Disease**, v. 91, n. 2, p. 220-225, 2007.

HALLIDAY, G.; BEADLE, M. **Flora Europaea**, London: Cambridge, v. 3, p. 185-186, 1972.

HONGSANAN, S.; HYDE, K. D.; BAHKALI, A. H.; CAMPORESI, E.; CHOMNUNTI, P.; EKANAYAKA, H.; GOMES, A. A. M.; HOFSTETTER, V.; JONES, E. B. G., PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L.; TIAN, Q.; WANASINGHE, D. N.; XU, J.; BUYCK, B. Fungal Biodiversity Profiles 11–20. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 36, n. 3, p.355-380, 2015.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12ª ed. São Paulo: Nacional, 1998.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 487-505, 2012.

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

KUDALKAR, P.; STROBEL, G.; UL-HASSAN, S. R.; GEARY, B. *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. **Mycoscience**, n. 53, p. 319-325, 2012.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Report**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.

LACAIVA, P. T.; SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos: diversidade e aplicações biotecnológicas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Fungos: Biologia, Bioquímica e biotecnologia**. 2ª. ed. Caxias do Sul: EDUCS, v. 1, p. 533-568, 2010.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; DELLA COLLETA FILHO, H. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico, Fundag, cap. 18, p. 511-558, 2005.

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

LI, Q.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; HSIANG, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological control**, n. 61, p. 113 -120, 2012.

LIU, L.; SUI, Y.; WISNIEWKI, M.; DROBY, S.; LIU, Y. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, n. 167, p. 153-160, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D.; CLARK, D. P. BROCK - Biology of Microorganisms. 10. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2010. 1019 p.

MAIA, L.C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, RC., org., *et al.* Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: **Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 1, p. 43-48, 2010.

MARCEL-HOUBEN M.; BALLESTER, A. R; DE LA FUENTE, B.; HARRIES, E.; MARCOS, J.F.; GONZALEZ-CANDELAS, L.; GABALDON, T. **BMC Genomics**, n. 13, p. 646-653, 2012.

MARTINS, R. E.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E.; **Plantas Medicinais**, Viçosa: Ed. UFV, 1998, p. 155.

MELO, B.; SOUZA, L. B. Biologia Da Reprodução de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 2, p. 01-07, 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.

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

MESHAM, V.; KAPOOR, N.; SAXENA, S. *Muscodor kashayum* sp. Nov. – a new volatile antimicrobial producing endophytic fungus. **Mycology**, v. 4, n. 4, p. 196-204, 2013.

MESHAM, V.; SAXENA, S.; KAPOOR, N. *Muscodor strobilii*, a new endophytic species from South India. **Mycotaxon**, v. 128, p. 93-104, 2014.

MESHAM, V.; GUPTA, M.; SAXENA, S. *Muscodor ghoomensis* and *Muscodor indica*: new endophytic species based on morphological features and molecular and volatile organic analysis from Northeast India. **Sydowia**, n. 67, p.133-146, 2015.

MICHEL, P. F. *Ginkgo biloba*: L'Arbre Qui à Vaincu Le Temps Félin'. Paris: **John Libbey**, p. 71-76, 1986.

MITCHELL, A. M.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; VARGAS, P. N.; EZRA, D. *Muscodor crispus*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 37-43, 2008.

MOREIRA, H. J. C.; BRAGANÇA, H. B. N., **Manual de Identificação de Espécies: Hortifrúti**. FMC Agricultural Products: São Paulo, 2011. 1017p.

**MYCOBANK**. Disponível em: < <http://www.mycobank.org>>. Acesso em: 01/06/2016.

NETO P. A. S. P; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Microrganismos endofíticos Interação com plantas e potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, 2002.

NEVES, E. M.; BOTEON, M. Impactos alocativos e distributivos na citricultura. **Preços Agrícolas**, v. 136, n. 12, p. 3-6, 1998.

NUNES, C. A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **Eur J Plant Pathol**, v. 133, n. 1, p. 181-196, 2012.

PLANTAS MEDICINAIS FITOTERAPIA. Café: Benefícios e Propriedades Medicinais. 2016. Disponível em: <<http://www.plantasmedicinasefitoterapia.com/cafe-cofeaarabica-efeitos-propriedades.html>>. Acesso em: 01/06/2016.

PEÑA, L. C. ***Muscodor* spp isolados no Brasil**: identificação, produção de compostos voláteis e potencial uso em controle biológico. 88f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S. S. (Eds). **Microbial Ecology of Leaves**, p. 179-197, 1991.

POLONIO, J. C. **Seleção de fungos endofíticos de Guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) com atividade antimicrobiana e produção de ácido 3-nitropropionico, com ênfase em *Diaphorte citri***. 110f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia

Ambiental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, n. 1, p. 17-20, 1985.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 19, n. 2, p. 650-659, 2009.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E. MOYNA, PATRICK. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SAXENA, S.; MESHRAM, V.; KAPOOR, N. *Muscodor darjeelingensis*, a new endophytic fungus of *Cinnamomum camphora* collected from northeastern Himalayas, **Sydowia**, n. 66, p. 55-67, 2014.

SAXENA, S.; MESHRAM, V.; KAPOOR, N. *Muscodor tigerii* sp, nov. - Volatile antibiotic producing endophytic fungus the Northeastern Himalayas. **Annal of Microbiology**, 2015.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A; CHEN, W. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **PNAS**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, n. 50, p. 205-221, 2009.

SHOLBERG, P. L.; GAUNCE, A. P. Fumigation of fruit with acetic acid to prevent postharvest decay. **Horticultural Science**, Stuttgart, v. 30, p. 1271-1275, 1995.

SIDDIQUI, R. R.; AHMAD, H.; SHAKOOR, C. S.; EHTESHAMUDDIN, A.F.M.; SHIREEN, S. Antimicrobial activity of essential oils. Part II. **Pak J Scient Ind Res**, v. 39, p. 43-47, 1996.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Rev Bras Farmacogn**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

SINGH, S. K.; STROBEL, G. A.; KNIGHTON, B.; GEARY, B.; SEARS, J.; EZRA, D. An Endophytic Phomopsis sp. Possessing Bioactivity and Fuel Potential with its Volatile Organic Compounds. **Microb Ecol**, v. 61, p. 729-739, 2011.

SIRI-UDOM, S.; SUWANNARACH, N.; LUMYONG, S. Existence of *Muscodor vitigenus*, *M. equiseti* and *M. heveae* sp. nov. in leaves of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.), and their biocontrol potential. **Ann Microbiology**, n. 66, p. 437-448, 2015.

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.

STROBEL, G. A.; DIRKSE, E.; SEARS, J. MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, n. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Ver**, n. 67, p. 491–502, 2003.

STROBEL, G. A. *Muscodor* species- endophytes with biological promise. **Phytochem Ver**, n. 10, 165–17, 2011.

SUWANNARACH, N.; BUSSABAN, B.; HYDE, K.; LUMYONG, S. *Muscodor cinnamomi*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. **Mycotaxon**, n. 114, p. 15–23, 2010.

SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; BUSSABAN, B.; HYDE, K. D; MUTSUI, K.; LUMYONG, S. Four New Species of *Muscodor* from Northern Thailand. **Annals of Microbiology**, 2012.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**. Stanford, v. 82, p. 218-226, 1990.

WORAPONG, J.; STROBEL, G; HESS, W. M. *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, n. 79, p. 67-79, 2001.

WORAPONG, J.; STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U. F.; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Muscodor roseus* anam. sp. nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. **Mycotaxon**, n. 81, p. 463-475, 2002.

YUAN, Z.; SU, Z.; MAO, L.; PENG, Y.; YANG, G.; LIN, F.; ZHANG, C. Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of *Muscodor* (Xylariaceae). **The Journal Of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 15-23, 2011.

ZHANG; WANG; MAO; KOMON-ZELAZOWSKA; YUAN; LIN; DRUZHININA; KUBICEK. *Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. **Fungal Biology**, n. 114, p. 797-808, 2010.

ZOU, W. X.; TAN, R. X., Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, n. 18, p. 448-459, 2001.

## APÊNDICES

### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	2110.55590	351.75932	67.8625 **
Resíduo	28	145.13551	5.18341	
Total	34	2255.69142		

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

GL	GLR	F-crit	F	p
6	28	3.5276	67.8625	<.0001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	34.71320	a
2	21.49340	bc
3	9.12560	d
4	19.15560	c
5	21.03280	bc
6	24.82160	b
7	12.18740	d
-----		
dms =	4.56434	

MG = 20.36137

CV% = 11.18

Ponto médio = 22.27900

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

#### Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.94792	0.09783	Sim

#### DADOS

35.499	31.828	34.177	35.254	36.808
18.870	25.940	20.357	23.021	19.279
7.750	8.058	9.105	9.508	11.207
18.474	20.650	20.650	19.867	16.137
18.776	20.926	25.616	19.807	20.039
27.182	23.925	29.180	21.223	22.598
11.524	11.768	13.331	12.466	11.848

Apêndice 1. Análise estatística do teste de antagonismo contra o fitopatógeno *Penicillium digitatum* aos 6 dias de tratamento.

## ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

Hipótese nula (H0):

Os tratamentos provêm de uma mesma população

Ao nível de 5% de probabilidade

H = 31.2958 H-crit = 12,5916

p-valor &lt; 0.05 H0 foi rejeitada

Tratamento	Repetições	SomaDosPostos	Média	alfa-5%
1	5	165.0000	33.0000	c
2	5	127.0000	25.4000	bc
3	5	17.0000	3.4000	a
4	5	76.0000	15.2000	abc
5	5	83.0000	16.6000	abc
6	5	124.0000	24.8000	bc
7	5	38.0000	7.6000	ab

## Comparações múltiplas

Comparação	Diferença	DiferençaCrít	alfa	Diferentes
1 - 2	7.6	19.6878	0.05	Não
1 - 3	29.6	19.6878	0.05	Sim
1 - 4	17.8	19.6878	0.05	Não
1 - 5	16.4	19.6878	0.05	Não
1 - 6	8.2	19.6878	0.05	Não
1 - 7	25.4	19.6878	0.05	Sim
2 - 3	22	19.6878	0.05	Sim
2 - 4	10.2	19.6878	0.05	Não
2 - 5	8.8	19.6878	0.05	Não
2 - 6	0.6	19.6878	0.05	Não
2 - 7	17.8	19.6878	0.05	Não
3 - 4	11.8	19.6878	0.05	Não
3 - 5	13.2	19.6878	0.05	Não
3 - 6	21.4	19.6878	0.05	Sim
3 - 7	4.2	19.6878	0.05	Não
4 - 5	1.4	19.6878	0.05	Não
4 - 6	9.6	19.6878	0.05	Não
4 - 7	7.6	19.6878	0.05	Não
5 - 6	8.2	19.6878	0.05	Não
5 - 7	9	19.6878	0.05	Não
6 - 7	17.2	19.6878	0.05	Não

## DADOS

61.965	64.376	64.861	60.822	58.498
30.524	31.703	31.682	29.613	28.144
8.824	9.861	11.039	12.425	12.156
21.508	26.458	26.458	27.123	20.489
19.764	27.411	28.912	26.159	23.473
35.662	31.982	29.992	27.375	27.614
14.998	17.236	16.304	12.041	14.557

Apêndice 2. Análise estatística do teste de antagonismo contra o fitopatógeno *Penicillium digitatum* aos 10 dias de tratamento.

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	6	0.46242	0.07707	2.1953 ns
Resíduo	28	0.98302	0.03511	
Total	34	1.44544		

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

GL	GLR	F-crit	F	p
6	28	2.4453	2.1953	0.0735

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	1.61600 a
2	1.40260 a
3	1.31400 a
4	1.24220 a
5	1.48260 a
6	1.41260 a
7	1.31900 a

dms = 0.37564

MG = 1.39843

CV% = 13.40

Ponto médio = 1.51900

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

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.94059	0.05830	Sim

## DADOS

1.331	1.586	1.675	1.975	1.513
1.431	1.262	1.358	1.481	1.481
1.475	1.207	1.296	1.145	1.447
1.254	1.205	1.095	1.411	1.246
1.339	1.368	1.583	1.191	1.932
1.157	1.436	1.510	1.510	1.450
1.245	1.063	1.625	1.383	1.279

Apêndice 3. Análise estatística do teste de antagonismo contra o fitopatógeno *Colletotrichum graminicola* aos 2 dias de tratamento.

## ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

Hipótese nula (H0):

Os tratamentos provêm de uma mesma população

Ao nível de 5% de probabilidade

H = 23.6295 H-crit = 12,5916

p-valor &lt; 0.05 H0 foi rejeitada

Tratamento	Repetições	SomaDosPostos	Média	alfa-5%
1	5	165.0000	33.0000	b
2	5	32.0000	6.4000	a
3	5	86.0000	17.2000	ab
4	5	107.0000	21.4000	ab
5	5	122.0000	24.4000	ab
6	5	50.0000	10.0000	a
7	5	68.0000	13.6000	ab

## Comparações múltiplas

Comparação	Diferença	DiferençaCrít	alfa	Diferentes
1 - 2	26.6	19.6864	0.05	Sim
1 - 3	15.8	19.6864	0.05	Não
1 - 4	11.6	19.6864	0.05	Não
1 - 5	8.6	19.6864	0.05	Não
1 - 6	23	19.6864	0.05	Sim
1 - 7	19.4	19.6864	0.05	Não
2 - 3	10.8	19.6864	0.05	Não
2 - 4	15	19.6864	0.05	Não
2 - 5	18	19.6864	0.05	Não
2 - 6	3.6	19.6864	0.05	Não
2 - 7	7.2	19.6864	0.05	Não
3 - 4	4.2	19.6864	0.05	Não
3 - 5	7.2	19.6864	0.05	Não
3 - 6	7.2	19.6864	0.05	Não
3 - 7	3.6	19.6864	0.05	Não
4 - 5	3	19.6864	0.05	Não
4 - 6	11.4	19.6864	0.05	Não
4 - 7	7.8	19.6864	0.05	Não
5 - 6	14.4	19.6864	0.05	Não
5 - 7	10.8	19.6864	0.05	Não
6 - 7	3.6	19.6864	0.05	Não

## DADOS

61.882	63.208	66.894	64.801	67.388
17.770	18.986	13.966	20.736	20.736
24.782	25.672	21.066	20.924	21.595
27.642	25.786	24.562	22.104	21.640
24.225	27.681	23.901	26.632	27.077
17.395	14.385	20.231	20.231	28.293
23.687	24.079	21.822	17.901	20.258

Apêndice 3. Análise estatística do teste de antagonismo contra o fitopatógeno *Colletotrichum graminicola* aos 10 dias de tratamento.