

GIZELI DE SOUZA SANTOS

**FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA
PRODUZEM VOLÁTEIS TÓXICOS A
PATÓGENOS DE EUCALIPTO**

LAVRAS – MG

2015

GIZELI DE SOUZA SANTOS

**FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA PRODUZEM VOLÁTEIS
TÓXICOS A PATÓGENOS DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Maria Alves Ferreira

Lavras - MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santos, Gizeli de Souza.

Fungos apodrecedores de madeira produzem voláteis tóxicos a patógenos de eucalipto / Gizeli de Souza Santos. – Lavras : UFLA, 2015.

55 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Maria Alves Ferreira.

Bibliografia.

1. Compostos orgânicos voláteis. 2. Calonectria. 3. Rhizoctonia solani. 4. Xanthomonas axonopodis. 5. Ralstonia solanacearum. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

GIZELI DE SOUZA SANTOS

FUNGOS APODRECEDORES DE MADEIRA PRODUZEM VOLÁTEIS
TÓXICOS A PATÓGENOS DE EUCALIPTO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015

Dr. Hudson Teixeira

EPAMIG

Dr. Vicente Paulo Campos

UFLA


Dra. Maria Alves Ferreira

Orientadora

Lavras – MG

2015

*Dedico a Deus, quem sempre iluminou o meu caminho; a minha mãe e
minha vó: Nelci de Souza Santos e Jovina Maria da Silva, a quem devo
tudo que sou e aos meus irmãos: Ivone, Raquel e Bruno pelo apoio.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por permitir a realização do mestrado;

A CAPES, pela bolsa de estudos;

À Professora Maria Alves Ferreira, pela orientação, compreensão, força, confiança e amizade. Sou muito grata!

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia - DFP/UFLA, por toda ajuda e principalmente ao professor Vicente Paulo Campo, pela orientação e permissão para uso do laboratório de nematologia;

A minha mãe Nelci e minha vó Jovina e aos meus irmãos, tias, tios, a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

As minhas queridas colegas de laboratório; Thaissa, Lívia, Renata, Noemi, Luiza, Abigail e Blenda, pela amizade e ajuda na condução do experimento;

A todos os alunos do DFP, especialmente aos amigos do laboratório de nematologia, Aline, Julio, Luma, Simone, Liliana, Arinaldo, Eduardo, Willian, Cleber e Tarley, pelo companheirismo e também ajuda nos experimentos;

Aos amigos, Nayara Norrene, Natalia Martins, Lívia Pimenta, Aceide Cardoso, Manoel Junior, Poliana Lima e Thaissa de Paula pela convivência, aprendizado, apoio, amizade e pelos momentos de descontração que fizeram destes anos inesquecíveis.

RESUMO

Estudos relacionados à influência de compostos orgânicos voláteis (COVs), produzidos por fungos associados à madeira podem levar à descoberta de compostos antagonísticos para diversos patógenos que atacam espécies de importância florestal. Desta forma objetivou-se, com esse trabalho, selecionar fungos associados à madeira produtores de COVs com efeito tóxico à *Calonectria pteridis*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* e *Ralstonia solanacearum*; identificar as espécies de fungos de podridão selecionadas, verificar a infectividade de *C. pteridis* em mudas de eucalipto e a colonização de *R. solani* em iscas biológicas após exposição aos COVs dos fungos selecionados. Após 8 horas de exposição aos COVs, emitidos por 39 isolados fúngicos associados à madeira causaram redução significativa no número de conídios germinados de *C. pteridis* e quatro isolados não diferiram da testemunha variando de 32 a 86%. Quando os conídios foram expostos aos COVs de sete isolados fúngicos selecionados *in vitro* ocorreu redução do número de lesões nas folhas onde foi aplicada a suspensão quando comparada com a testemunha na infecção em plantas de eucalipto. Os COVs desses fungos também reduziram o número de colônias de *R. solani*, após exposição por 48 horas, em relação à testemunha. Constatou-se a formação de um grupo de 16 isolados, que testados em iscas de eucalipto reduziu em 42,5 a 84% a colonização em relação à testemunha. O número de unidades formadoras de colônias (u.f.c.) de *X. axonopodis* e *R. solanacearum* foi inferior à testemunha, significativamente, quando expostas aos COVs dos fungos de podridão de madeira. Constatou-se a formação de três grupos de isolados para *X. axonopodis*, que diferiram, significativamente, da testemunha, sendo que os isolados respectivamente do primeiro grupo apresentaram de 84 a 94%, do segundo grupo 61 a 79% e do terceiro grupo de 42 a 52% de redução no número de u.f.c. Observou-se a formação de seis grupos de isolados quando testado os COVs com *R. solanacearum*. O primeiro grupo apresentou de 71 a 92%, o segundo grupo 48 a 68%, o terceiro grupo 37 a 44%, o quarto grupo formado por três isolados variou de 26 a 30% e o PD21 e o PD37 apresentaram uma redução de 7 e 20% em relação à testemunha.

Palavras chaves: Compostos Orgânicos Voláteis, *Calonectria*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis*, *Ralstonia solanacearum*, Fungos de podridão.

ABSTRACT

The studies related to the influence of Volatiles Organic Compounds (VOCs) produced by fungi associated with the wood, may lead to the discovery of compounds antagonistic to pathogens that attack several species of forest importance. Thus, it is aimed, with this, work select fungi associated with wood producers of VOCs with toxic effect to *Calonectria pteridis*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* and *Ralstonia solanacearum*; identify species selected rot fungi, verify infectivity of *C. pteridis* in eucalyptus plants and colonization of *R. solani* biological baits after exposure of VOCs to the selected fungi. After 8 hours of exposure to VOCs, all emitted by 44 wood fungal isolates caused a significant reduction in the number of conidia of *C. pteridis* ranging from 32 to 86% compared with the control. When conidia were exposed to seven isolates emitting VOCs in vitro, there was reduction in the number of lesions on the leaves where the suspension was applied as compared to the infection control in eucalyptus. VOCs these fungi also reduced the number of *R. solani* colony, after exposure for 48 hours, compared to the control. There was the formation of a group of 16 isolates that tested colonized eucalyptus baits with *R. solani* reduced by 42.5 to 84% of baits contaminated. The number of colony forming units (cfu) of *X. axonopodis* and *R. solanacearum* reduced significantly when exposed to VOCs from wood decay fungi. It was found the formation of three groups for *X. axonopodis*, which differed significantly from the control. The first group of isolates showed 84 to 94%, the isolates of the second group and 61 to 79% of isolates third group from 41.5 to 51.5% reduction in the number of c.f.u. There were the formation of six groups of isolates when tested VOCs with *R. solanacearum*. The first group was 70.8 to 92.4%, the second set 48 to 68%, the third group 37 to 44%, the fourth group formed by three isolates ranged from 26 to 30% and the PD21 and PD37 the submitted a reduction of 7 and 20% compared to control.

Keywords: Volatile Organic Compounds, *Calonectria*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis*, *Ralstonia solanacearum*, wood decay fungi.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Fungos associados às madeiras.....	13
2.2 Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)	14
REFERÊNCIAS.....	19
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1.INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Isolamento, preparo e manutenção dos isolados de fungos associados à madeira	28
2.4 Seleção <i>in vitro</i> de isolados fúngicos associados à madeira quanto a produção de COVs tóxicos a <i>Calonectria pteridis</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>. ...	34
2.5 Efeito dos COVs na toxicidade de fragmentos de micélio de <i>Rhizoctonia solani</i> em iscas de eucalipto.	35
2.6 Efeito dos COVs na infectividade de conídios de <i>Calonectria pteridis</i> em mudas de eucalipto.....	36
2.8 Delineamento experimental e análise dos dados	37
2.9.1 Extração de DNA	38
2.9.2 Amplificação e purificação.....	39
2.9.3 Análises dos fragmentos da região ITS.....	39
3. RESULTADOS	40
3.1 Toxicidade de COVs fúngicos a conídios de <i>Calonectria pteridis</i>.	40
3.2 Infectividade de conídios de <i>Calonectria pteridis</i> após exposição aos COVs fúngicos de madeira em mudas de eucalipto.....	42
3.3 Toxicidade de COVs de isolados fungicos associados a madeira a fragmentos de micélio de <i>Rhizoctonia solani</i> expostos a eles.....	43

3.4 Colonização de iscas biológicas por <i>Rhizoctonia solani</i> após exposição aos COVs de fungos associados a madeira.	44
3.5 Toxicidade de COVs de isolados fungicos associados a madeira à <i>Xanthomonas axonopodis</i>.	45
5. CONCLUSÕES.....	52

1. INTRODUÇÃO

A cultura do eucalipto tem mostrado notável crescimento em muitas partes do mundo. Os estados brasileiros que se destacam com maior concentração de plantios florestais são Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Mato Grosso do Sul. Em 2012, a área brasileira de plantio de *Eucalyptus* atingiu 5,10 milhões de hectares, um crescimento de 2,2% em relação ao indicador de 2011. Os plantios de eucalipto representam 76,6% da área total plantada (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013). Essa cultura tem representado uma das mais importantes fontes de fibras, particularmente para a indústria de celulose e papel. No entanto, perdas significativas podem ocorrer devido à susceptibilidade de clones a várias doenças em mudas na fase de viveiro e no campo.

Em viveiros, inúmeros são os patógenos responsáveis por doenças na cultura, cuja incidência é variável de acordo com o estágio de desenvolvimento das mudas, hospedeiro e patógeno. Dentre elas podem-se citar: mela de *Rhizoctonia solani* Kuhn, manchas foliares e desfolha por diferentes espécies de *Calonectria* F.A. Wolf, além das doenças causadas por bactérias como *Xanthomonas axonopodis* e *Ralstonia solanacearum* (ALFENAS et al., 2009).

Na área agrônômica, métodos alternativos para o controle de patógenos têm sido estudados com o intuito de reduzir o uso de defensivos químicos. Já na área florestal, as pesquisas, nesse sentido são escassas. Entretanto a busca por moléculas menos tóxicas ao meio ambiente e ao homem é constante. Fungos associados à madeira, principalmente os de podridão, podem ser promissores para seleção de moléculas, uma vez que liberam enzimas que degradam os componentes da madeira como celulose, hemicelulose e lignina, produzindo diferentes metabólitos. Alguns desses fungos produzem ou induzem a produção

de metabólitos primários e secundários que se destacam por melhorar o desempenho do seu hospedeiro, protegendo-o de herbívoros, patógenos e situações ambientais adversas (CLAY; SCHARDL, 2002).

Dentre esses metabólitos destacam-se os compostos orgânicos voláteis (COVs), esses compostos possuem baixa massa molecular e podem pertencer a diversas classes químicas tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre (WHEATLEY, 2002). Apesar dos avanços no conhecimento sobre os voláteis de origem microbiana, os mecanismos que governam as etapas que vão desde ao reconhecimento do volátil até a expressão da resposta não foram claramente explicados (FRENCH, 1992).

É provável que muitos COVs ainda não tenham sido descobertos, perdendo seu potencial biotecnológico. Portanto os estudos relacionados à influência de COVs produzidos por fungos associados à madeira, podem levar à descoberta de compostos antagonísticos para diversos patógenos que atacam espécies de importância florestal e agrônômicas. Desta forma, objetivou-se, com este, trabalho selecionar fungos associados à madeira produtores de COVs com efeito tóxico à *C. pteridis*, *R. solani*, *X. axonopodis* e *R. solanacearum*; identificar as espécies de fungos de podridão selecionadas, verificar a infectividade de conídios de *C. pteridis* expostos aos COVs em mudas de eucalipto e a colonização de *R. solani* em iscas biológicas após exposição aos COVs dos fungos selecionados.

CAPÍTULO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos associados às madeiras

A produção de madeira desempenha papel de destaque na economia, pois apresenta uma ampla gama de aplicações. A versatilidade tecnológica da madeira, que pode ser serrada, dobrada, laminada, desfiada, oferece inúmeras opções de utilização. A adoção de medidas visando à sua preservação é altamente necessária garantindo uma maior durabilidade e economicidade na utilização desse recurso. Em função da sua complexidade anatômica e química pode sustentar uma rica comunidade de microrganismos (DIX; WEBSTER, 1995).

O ataque pode ocorrer por diferentes grupos de agentes fúngicos, na forma de emboloramentos, manchamentos internos e podridões. Geralmente, os primeiros fungos que colonizam as árvores recém-cortadas são os emboloradores de madeira, devido à grande quantidade de substâncias de reserva das quais eles se nutrem, e à elevada umidade (HANADA; SALES-CAMPOS; ABREU, 2003). O segundo grupo inclui os fungos de podridão que são classificados de acordo com a decomposição que causam: podridão branca ou marrom, causadas principalmente por basidiomicetos, e podridão mole causada por ascomicetos, que liberam enzimas que reagem com os constituintes da parede celular a nível molecular, causando a degradação desta estrutura (GIMENES, 2010).

A biodiversidade de fungos associados a madeiras é composta por representantes dos filos Ascomycota, Zygomycota e Basidiomycota (HUANG et

al., 2001; SRYANARAYANAN; WITTLINGER; FAETHSH, 2005), principalmente por fungos dos gêneros *Schizophyllum*, *Armillaria*, *Heterobasidion*, *Trametes*, *Pyconoporus*, *Fomes*, *Phellinus*, *Piptoporus*, (SCHMIDT, 2006) *Lasiodiplodia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* (HANADA; SALES-CAMPOS; ABREU, 2003), entre outros.

Os fungos pertencentes ao filo Basidiomycota utilizam como fonte de energia os substratos lignocelulósicos, fonte inacessível aos outros organismos, e podem produzir substâncias com propriedade de impedir ou controlar o crescimento de competidores (ROSA et al., 2005). Essas substâncias podem ser liberadas dos corpos de frutificação (basidiomas), e extraídas da biomassa micelial ou do substrato nutritivo onde o micélio do fungo se desenvolveu (meios de culturas sólidos ou líquidos).

Vários pesquisadores já relataram a atividade antibiótica de substâncias produzidas por basidiomicetos (BENEDICT; BRADY, 1972; IINUMA et al., 1983; KUPKA; ANKE; OBERWINKLER, 1979; ROSA et al., 2005; SMÂNIA et al., 1995) e os avanços tecnológicos vêm elucidando não só a atividade antibiótica como também demonstrando outras propriedades das substâncias produzidas por basidiomicetos. Assim, aos diferentes metabólitos de basidiomicetos é atribuída uma ou mais ações, tais como: atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (ROSA et al., 2005). Nos últimos anos, vários extratos obtidos de diferentes isolados de fungos basidiomicetos têm sido testados para avaliar possível efeito biológico e para bioprospecção de moléculas para várias finalidades.

2.2 Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)

A importância dos COVs antimicrobianos recebeu pouca atenção quando comparados ao antagonismo causado por substâncias difusíveis

(CHAURASIA et al., 2005). No entanto, recentemente, uma série de novos trabalhos tem focado nestes produtos metabólicos, que se apresentam como gases ou que possuem alta pressão de vapor, e que em condições normais são liberados da célula (TARKKA; PIECHULLA, 2007).

Os COVs são substâncias de baixa polaridade que possuem, aproximadamente, 20 átomos de carbono e que podem transpor as membranas com facilidade e serem liberados na atmosfera ou no solo, na ausência de uma barreira de difusão (PICHERSKY; NOEL; DURADEVA, 2006). São compostos que facilmente entram na fase gasosa pela vaporização de 0,01 kPa a uma temperatura de aproximadamente 20°C (PAGANS; FONT; SANCHEZ, 2006) e possuem baixa massa molecular e podem pertencer a diversas classes químicas, a maioria são lipossolúveis e, portanto, têm baixa solubilidade (WHEATLEY, 2002). Apesar de algumas limitações metodológicas e tecnológicas, os pesquisadores detectaram e caracterizaram cerca de 250 COVs a partir de fungos, como misturas de hidrocarbonetos simples, heterociclos, aldeídos, cetonas, álcoois, fenóis, tioálcoois, tioésteres e seus derivados, incluindo, entre outros, derivados de benzeno e ciclohexanos (KORPI; JARNBERG; PASANEN, 2009; ORTIZ-CASTRO et al., 2009).

Os COVs ocorrem na biosfera, ao longo de um intervalo de concentrações (WHEATLEY, 2002) e muitos são de origem microbiana (STAHL; PARKIN, 1996; STOTZKY; SCHNENCK, 1976) e vários são os relatos dos COVs de origem vegetal, fúngica e bacteriana atuando na resistência de plantas a pragas e doenças (ARIMURA et al., 2001; KISHIMOTO et al., 2005; KOST; HEIL, 2006). Essas substâncias podem agir diretamente no patógeno, atrair inimigos naturais e, ainda, atuarem como sinalizadoras para ativação de genes relacionados à resistência (ARIMURA et al., 2001).

Como a atividade microbiana e os fatores ambientais são interligados, a produção de COVs é dependente da dinâmica de todo o ecossistema. Devido às

características de fácil penetração pela membrana e distribuição eficiente pela porosidade do solo, os COVs aumentam a sua área de influência e, conseqüentemente, melhoram sua eficácia no controle de fitopatógenos (PICHERSKY; NOEL; DURADEVA, 2006).

A produção de compostos orgânicos voláteis depende de diversos fatores, tais como nutrientes disponíveis (BRUCE, 2000; ERZA; STROBEL, 2003), organismo produtor (BRUCE et al., 2004; KAI; EFFMERT; BIRGIT, 2007), temperatura, pH (TRIVEDI; PANDEY; PALNI, 2008) e fase de crescimento (BRUCE; KUNDZEWICZ; WHEATLEY, 1996).

Wheatley (2002) estudou interações mediadas por voláteis entre uma ampla gama de fungos e bactérias de solo. Os resultados demonstraram que os isolados fúngicos tiveram o crescimento micelial estimulado em até 40% ou inibido em até 60%, dependendo dos isolados bacterianos estudados. Chuankun et al. (2004) relataram que a supressividade de solos a fungos estava fortemente correlacionada a presença de COVs. Zou et al. (2007) também correlacionaram à atividade supressiva de solos à presença de COVs de ação fungistática produzidos por bactérias, em especial às do gênero *Bacillus*. Os solos apresentando tais isolados inibiram o crescimento micelial e a germinação de esporos dos fungos *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia*.

A maioria dos estudos relacionados à atividade antimicrobiana de COVs sobre microrganismos fitopatogênicos é realizada com os fungos *Muscodor albus* (GRIMME et al., 2007; STROBEL, 2006), *Trichoderma* spp. (BRUCE, 2000) e a bactéria do gênero *Bacillus* spp. (BRUCE et al., 2004). Estudos com COVs de fungos associados à a madeira podem ser promissores para controle de diversos

patógenos.

2.3 Doenças do eucalipto em fase de viveiro

Em viveiro, inúmeras são as doenças causadas por patógenos, sendo que a incidência varia de acordo com o estágio de desenvolvimento das mudas, hospedeiros e patógenos. As condições ambientais necessárias nas fases iniciais para a propagação clonal, como o enraizamento, são extremamente favoráveis ao desenvolvimento de fitopatógenos, principalmente os fungos, como exemplo *R. solani*, diferentes espécies de *Calonectria* além das doenças causadas por bactérias como *X. axonopodis* e *R. solanacearum* (ALFENAS et al., 2009).

O ataque por *R. solani* é um dos principais problemas fitossanitários que ocorrem na cultura do eucalipto em condições de viveiros e pode ocorrer em todas as fases da propagação clonal, mas principalmente no enraizamento (ALFENAS et al., 2009). Espécies de *Rhizoctonia* são habitantes naturais do solo, que sobrevivem saprofiticamente, colonizando a matéria orgânica, ou na forma de escleródios (FERREIRA, 1989). O patógeno provoca mela das folhas, morte de plantas e crescimento epifítico de micélio (teia micelial) sobre as estacas e/ou miniestacas. Raramente, sob condições favoráveis (ALFENAS et al., 2009).

Muitas espécies de *Calonectria*, frequentemente, causam doenças em viveiros de eucalipto no Brasil. Esse gênero é um dos principais responsáveis por doenças em mudas de eucalipto, como podridão-de-estacas, "damping-off" e manchas-foliares. As manchas foliares em mudas de eucalipto, causada por *Calonectria* spp. afetam o desenvolvimento da muda clonal, tornando-a debilitada e muitas vezes incapacitada para resistir às condições de campo. Geralmente seus sintomas podem ser confundidos com aquelas causadas por fitobactérias e *Phaeophleospora epicoccoides* (ALFENAS et al., 2009). A podridão-de-estacas gera uma lesão que inicia na base e progride até o

escurecimento total da estaca, causando a morte das gemas, e consequentemente inibindo o enraizamento (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JUNIOR, 2001).

Os sintomas causados por *X. axonopodis* podem variar dependendo da idade da folha, da fase de desenvolvimento da lesão e das espécies e/ou clones de eucalipto. A mancha foliar bacteriana caracteriza-se, inicialmente, por lesões encharcadas do tipo anasarca, internervurais, angulares e concentradas ao longo da nervura principal, nas margens ou distribuídas, aleatoriamente, sobre o limbo foliar. Com o progresso da doença, as lesões adquirem aspecto ressecado e coloração de marrom à palha, podendo conter orifícios no centro da lesão ou áreas recortadas pelo limbo consequência do aborto da área necrosada (GONÇALVES et al., 2008). A doença culmina com desfolha intensa devida à senescência precoce das folhas infectadas.

A murcha bacteriana, causada por *R. solanacearum* (YABUUCHI et al., 1995), em minijardim clonal (ALFENAS et al., 2006), é caracterizada por necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, murcha e morte de minicepas. Os sintomas na parte aérea são similares à morte gradual de minicepas submetidas a podas drásticas ou com sistema radicular malformado. Na fase de enraizamento, miniestacas infectadas podem apresentar arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão. No sistema atual de produção de mudas clonais de eucalipto, a coleta intensiva de brotações para estaquia e a realização de podas drásticas em minicepas induzem a morte de raízes o que resulta na debilitação fisiológica das plantas, tornando-as mais vulneráveis à infecção. Além disso, as frequentes fertirrigações e a temperatura elevada do leito de areia dos canteiros favorecem a multiplicação e disseminação do patógeno em minijardim clonal. Para controle de fitobactérias, inexistem produtos químicos eficientes. O controle, geralmente é preventivo. Quando os patógenos já estão instalados no viveiro são realizadas medidas de controle baseadas na erradicação e regulação do ambiente.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500 p.

ALFENAS, A. C. et al. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 357-366, set. 2006.

ARIMURA, G. et al. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1049-1061, Apr. 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF 2012**. Brasília, 2013. 149 p.

BENEDICT, R. G.; BRADY, L. R. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 61, n. 11, p. 1820-1821, 1972.

BRUCE, A. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. **Holzforschung**, Berlin, v. 54, p. 481-486, June 2000.

BRUCE, A. et al. Identification of volatile organic compounds (VOCs) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain fungi. **Holzforschung**, Berlin, v. 58, p. 193-198, Mar. 2004.

BRUCE, A.; KUNDZEWICZ, A.; WHEATLY, R. E. Influence of culture age on the volatile organic compounds produced by *Trichoderma aureoviridae* and associated inhibitory effects on selected wood decay fungi. **Materials and organisms**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 79-94, 1996.

CHAURASIA, B. et al. Diffusible and volatile compounds produced by antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic

fungi in vitro. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, n. 36, p. 75-81, Feb. 2005.

CHUANKUN, X. U. et al. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology e Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1997-2004, July 2004.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, Chicago, v. 160, n. 6, p. 99-127, Oct. 2002.

DIX, N. J.; WEBSTER, J. **Fungal ecology**. London: Chapman & Hall, 1995. v. 1, 549 p.

ERZA, D.; STROBEL, G. A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, p. 1229-1238, July 2003.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

FRENCH, R. C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spore. **Mycologia**, New York, v. 84, p. 227-288, 1992.

GIMENES, L. J. **Fungos basidiomicetos: técnicos de coleta, isolamento e subsídio para processos biotecnológicos**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2010. 19 p.

GONÇALVES, R. C. et al. Etiologia da mancha foliar bacteriana do eucalipto no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 180-188, jun. 2008.

GRIMME, E. et al. 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**, Saint Paul, v. 91, n. 2, p. 220-225, Feb. 2007.

HANADA, R. E.; SALES-CAMPOS, C.; ABREU, R. L. S. Fungos emboloradores e manchadores de madeiras no município de Manaus, Amazonas, Brazil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 3, p. 483-488, Apr. 2003.

HUANG, Y. et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 163-167, Mar. 2001.

IINUMA, H. et al. Basidalin, a new antibiotic from basidiomycetes. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 36, n. 4, p. 448-450, Apr. 1983.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BIRGIT, P. B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 187, p. 351-350, May 2007.

KISHIMOTO, K. et al. Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 7, p. 1093-1102, May 2005.

KORPI, A.; JARNBERG, J.; PASANEN, A. L. Microbial volatile organic compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 39, n. 2, p. 139-193, Feb. 2009.

KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defense in neighboring plants. **Journal of Ecology**, Durham, v. 94, n. 3, p. 619-628, May 2006.

KUPKA, J.; ANKE, T.; OBERWINKLER, F. Antibiotics from Basidiomycetes: VII Crinipellin, a new antibiotic from the Basidiomycetous fungus *Crinipellis stipitaria* (Fr.) Pat. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 32, n. 2, p. 130-135, Feb. 1979.

ORTIZ-CASTRO, R. et al. The role of microbial signals in plant growth and development. **Plant Signaling & Behaviour**, Bonn, v. 4, p. 701-712, Aug. 2009.

PAGANS, E.; FONT, X.; SANCHEZ, A. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 131, p. 179-186, Apr. 2006.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DURADEVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, Washington, v. 10, n. 311, p. 808-811, Feb. 2006.

ROSA, L. H. et al. Antifungal and other biological activities from *Oudemansiella canarii* (Basidiomycota). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 983-987, Dec. 2005.

SANTOS, F. A.; AUER, G. C.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Colombo: EMBRAPA Floresta, 2001. 20 p. (Circular Técnica, 45).

SCHMIDT, O. **Wood and tree fungi: biology, damage, protection and use**. Berlin: Springer, 2006. 334 p.

SMÂNIA, A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 45, n. 3, p. 177-181, Mar. 1995.

SRYANARAYANAN, T. S.; WITTLINGER, S. K.; FAETH, S. H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 5, p. 635-639, May 2005.

STAHL, P. D.; PARKIN, T. B. Microbial production of volatile organic compounds in soil microcosms. **Soil Science Society of America Journal**, Fayetteville, v. 60, n. 3, p. 821-828, May 1996.

STOTZKY, G.; SCHENCK, S. Volatile organic compounds and microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 4, p. 333-382, May 1976.

STROBEL, G. *Muscodor albus* and its biological promise. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, Heidelberg, v. 33, n. 7, p. 514-522, Feb. 2006.

TARKKA, M. T.; PIECHULLA, B. Aromatic weapons: truffles attack plants by the production of volatiles. **The New Phytologist**, London, v. 175, n. 3, p. 381-383, Aug. 2007.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S. In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 163, p. 329-336, Aug. 2008.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 357-364, Aug. 2002.

YABUUCHI, E. et al. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology Immunology**, Tokyo, v. 39, n. 11, p. 897-904, Nov. 1995.

ZOU, C. S. et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology e Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 9, p. 2371-2379, Sept. 2007.

CAPÍTULO 2

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR FUNGOS ASSOCIADOS À MADEIRA TÓXICOS A *Calonectria pteridis*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* e *Ralstonia solanacearum*.

RESUMO

Estudos com fungos associados à madeira para prospecção de moléculas podem ser promissores para a utilização no controle de patógenos florestais e contribuir para a elaboração de substâncias de baixa toxicidade e fácil manipulação. Desta forma, objetivou-se, com este trabalho: selecionar fungos associados à madeira produtores de COVs tóxicos à *Calonectria pteridis*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* e *Ralstonia solanacearum*; identificar as espécies de fungos de podridão selecionadas; verificar a infectividade de *C. pteridis* em mudas de eucalipto e a colonização de *R. solani* em iscas biológicas após exposição aos COVs dos fungos selecionados. Este trabalho foi realizado empregando-se a técnica desenvolvida com tubo SUPELCO®, que após 8 horas de exposição aos COVs emitidos por todos os 44 isolados fúngicos associados à madeira causaram redução significativa no número de conídios germinados de *C. pteridis* variando de 32 a 86% em comparação com a testemunha ($P < 0,05$). Todos os isolados selecionados foram eficientes em reduzir a infecção de *C. pteridis* em mudas de eucalipto em comparação com a testemunha ($P < 0,05$). O número de colônias de *R. solani*, após exposição por 48 horas aos COVs dos fungos de podridão de madeira foi inferior, em 16 a 93% significativamente, em relação à testemunha ($P < 0,05$). Constatou-se a formação de um grupo de 16 isolados selecionados em teste *in vitro* que foi eficiente na redução de 42,5 a 84% de iscas colonizadas com *R. solani*. O número de unidades formadoras de colônias (u.f.c.) de *X. axonopodis* e *R. solanacearum* reduziu significativamente quando expostas aos COVs dos fungos de podridão de madeira ($P < 0,05$).

Palavras-chave: Patógenos florestais, moléculas tóxicas, eucalyptus, controle.

CHAPTER 2

VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS PRODUCED BY FUNGI ASSOCIATED WITH WOOD AND TOXIC TO *Calonectria pteridis*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* AND *Rasltonia solanacearum*

ABSTRACT

Studies about fungi associated with wood, especially wood decay fungi for prospecting molecules can be used in the control of forest pathogens and contribute to the development of substances of low toxicity and easy handling. Thus, it is aimed, with this work, select fungi associated with wood producers of volatiles organics compounds (VOCs) with toxic effect to *Calonectria pteridis*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* and *Rasltonia solanacearum*; identify species selected rot fungi, verify infectivity of *C. pteridis* in eucalyptus plants and colonization of *R. solani* in biological baits VOCs after exposure to the selected wood decay fungi. The work was carried out with technique that allows contact of the air molecules of wood decay fungi to pathogens, it was found, using the technique developed by SUPELCO® tube after 8 hours of exposure to VOCs. Forty four wood decay fungi emitted VOCs that caused significant reduction in the number of conidia of *C. pteridis* ranging from 32 to 86% compared to control ($P < 0.05$). All selected isolates were effective in reducing infection *C. pteridis* in eucalyptus seedlings compared to the control ($P < 0.05$). The number of colonies of *R. solani*, after exposure for 48 hours to VOCs from wood decay fungi reduced, 16 to 93% significantly compared to the control ($P < 0.05$). There was the formation of a group of 16 isolates selected in vitro test that is effective in reducing from 42.5 to 84% in the number of baits colonized with *R. solani*. The number of colony forming units (c.f.u) of *R. solanacearum* and *X. axonopodis* significantly reduced when exposed to the VOCs of the wood rot fungi ($P < 0.05$).

Keywords: forest pathogens, eucalyptus, toxic molecules, control

1. INTRODUÇÃO

A participação de produtos florestais brasileiros representa menos de 3% do comércio anual internacional, que supera o valor de US\$ 230 bilhões (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2009). A cultura do eucalipto representa altos investimentos, de toda a riqueza gerada no País, fornecendo produtos para a indústria, na produção de energia e de celulose para a confecção de papel (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013).

O eucalipto é atacado por diversas doenças destacando várias delas que afeta a produção de mudas em viveiros clonais como *Calonectria* sp., *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* e *Ralstonia solanacearum* (ALFENAS et al., 2009). Os sintomas de maneira geral para os fungos são manchas foliares seguida por intensa desfolhas, podridão-de-estacas e “damping-off”. *Xanthomonas axonopodis* causa manchas foliares e desfolha, *R. solanacearum* provoca murcha vascular do eucalipto (ALFENAS et al., 2009; GONÇALVES et al., 2008).

São vários métodos de controle de doenças florestais. Na eucaliptocultura são mais utilizados clones resistentes e fungicidas sintéticos em casos esporádicos (ALFENAS et al., 2009). No entanto nem sempre existem clones resistentes a todos os patógenos de importância do eucalipto e os fungicidas causam grande impacto ambiental além da escassez de registros para as plantações florestais.

A busca por novas moléculas fungicidas e eficazes no controle de doenças em plantios florestais bem como métodos alternativos é importante para reduzir o impacto ambiental (GU et al., 2007). Neste contexto os produtos voláteis são

menos tóxicos ao homem e causam pouco impacto ambiental e, portanto podem ser úteis de base para o desenvolvimento de novas moléculas. Voláteis tóxicos a fitopatógenos que atacam plantas podem ser encontradas em fungos associados a podridão de madeira e constituem o início para a prospecção de novas moléculas fungicidas menos tóxicas ao meio ambiente e ao homem. Esses fungos têm sido apontados como promissores no controle de fitopatogenos, pois utiliza substrato lignocelulósicos, inacessível a muitos microorganismos, além de produzir substratos inibidores do crescimento de competidores (ROSA, 2003).

Apesar dos compostos orgânicos voláteis (COVs) terem sido encontrados em outras espécies e isolados fúngicos e bacterianos (BRUCE et al., 2003; DUDAREVA et al., 2006; FREIRE et al., 2012; WHEATLEY, 2002) ainda não foram estudados com fungos aprodcedores de madeira para controle de patógenos florestais. Desta forma objetivou-se com este, trabalho selecionar fungos associados à madeira produtores de COVs com efeito tóxico à *C. pteridis*, *R. solani*, *X. axonopodis* e *R. solanacearum*; identificar as espécies selecionadas, verificar a infectividade de conídios de *C. pteridis* expostos aos COVs em mudas de eucalipto e a colonização de iscas biológicas por *R. solani* após exposição aos COVs dos fungos selecionados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento, preparo e manutenção dos isolados de fungos associados à madeira

Foram utilizados 37 isolados de fungos associados à madeira (PIMENTA, 2013; SILVA, 2014), e 20 foram coletados de diferentes substratos (árvores e tocos em decomposição) nos fragmentos florestais e árvores urbanas das cidades de Lavras (UFLA), Viçosa (UFV) e Silveirânia no estado de Minas Gerais, totalizando 57 isolados empregados nos ensaios (TABELA 1).

Para o isolamento dos fungos, fragmentos foram retirados de corpos de frutificação e/ou porção de tecidos de madeiras em decomposição. O material coletado foi desinfestado superficialmente em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito 5% e eliminando o excesso de hipoclorito com água esterilizada. Após desinfestação superficial, o material foi transferido para placa de Petri contendo Batata Dextrose Agar (BDA Himedia®) e incubado a 25°C por sete dias para o crescimento das colônias e obtenção da cultura pura. Posteriormente, os isolados foram armazenados em: tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, tubos de *ependorfs* contendo glicerol 15% conservados a -80°C e em tubos de *ependorfs* contendo NaCl 0,85% mantidos em temperatura ambiente (CASTELLANI, 1939). O método de Castellani foi utilizado para retirada dos isolados para realização dos experimentos. Os demais métodos foram utilizados para manutenção e evitar possíveis perdas de isolados.

Tabela 1. Isolados fúngicos obtidos de diferentes substratos coletados nas cidades de Lavras, Silveirânia e Viçosa em Minas Gerais.

Código	Gênero e/ou espécie	Substrato	Cidade	Referência
PD1	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Galho morto, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD2	<i>Lentinus crinitus</i>	Galho morto, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD4	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD5	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD8	<i>Epicoccum nigrum</i>	Tronco morto	Lavras	Pimenta (2013)
PD9	*	Tronco morto, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	-
PD10	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Tronco morto, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Pimenta (2013)
PD12	*	Tronco morto, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Pimenta (2013)
PD13	<i>Schizophyllum commune</i>	Tronco morto, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Pimenta (2013)
PD14	<i>Phanerochaete chysosporium</i>	Tronco morto, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Pimenta (2013)
PD15	*	*	Lavras	-
PD16	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Tronco em decomposição	Silveirânia	Silva (2014)
PD17	<i>Schizophyllum commune</i>	Tronco em decomposição	Silveirânia	Silva (2014)
PD18	*	Tronco morto, <i>Pinus</i> sp.	Lavras	-
PD19	*	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)
PD20	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)

Tabela 1 continua

Código	Gênero e/ou espécie	Substrato	Cidade	Referência
PD22	<i>Nigrospora</i> sp.	Tronco em decomposição	Lavras	Pimenta (2013)
PD23	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD24	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD25	*	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)
PD26	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD27	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Tronco em decomposição	Lavras	Pimenta (2013)
PD28	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)
PD29	<i>Schizophyllum commune</i>	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)
PD30	<i>Xylaria curta</i>	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)
PD31	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD32	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD33	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD35	<i>Scytalidium</i> sp.	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)
PD36	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD37	*	Tronco em decomposição	Lavras	-
PD41	*	Tronco em decomposição	Lavras	-

Tabela 1 continua

Código	Gênero e/ou espécie	Substrato	Cidade	Referência
PD43	*	<i>Tronco em decomposição</i>	Lavras	-
PD44	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Delonix regia</i>	Lavras	Silva (2014)
PD45	<i>Ganoderma</i> sp	<i>Delonix regia</i>	Lavras	Silva (2014)
PD46	<i>Ganoderma</i> sp	<i>Delonix regia</i>	Lavras	Silva (2014)
PD47	<i>Xylaria</i> sp.	Galho morto	Lavras	Silva (2014)
PD48	<i>Xylaria</i> sp.	Galho morto	Lavras	Silva (2014)
PD50	<i>Gymnopilus lepidotus</i>	Tronco morto, <i>Cinnamomum</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD51	<i>Ganoderma subamboinense</i>	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)
PD52	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Acacia</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD53	*	<i>Cinnamomum</i> sp.	Lavras	-
PD54	*	<i>Cinnamomum</i> sp.	Lavras	-
PD55	*	<i>Cinnamomum</i> sp.	Lavras	-
PD56	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Tronco em decomposição	Lavras	Silva (2014)
PD57	*	<i>Cinnamomum</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD58	<i>Ganoderma subamboinense</i>	<i>Cinnamomum</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD59	<i>Arthrimum</i> sp.	<i>Caesalpinia</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD60	<i>Ganoderma parvulum</i>	<i>Caesalpinia</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD62	*	Tronco, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	-

Tabela 1 conclui

Código	Gênero e/ou espécie	Substrato	Cidade	Referência
PD63	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	Tronco, <i>Pinus</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD64		Painel em decomposição	Lavras	-
PD65	<i>Stereum hirsutum</i>	Tronco morto, <i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD66	<i>Lentinus bertieri</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD67	*	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras	Silva (2014)
PD68	<i>Trametes elegans</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	Lavras	Silva (2014)
PD69	<i>Ganoderma parvulum</i>	<i>Delonix regia</i>	Lavras	Silva (2014)
PD70	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Delonix regia</i>	Viçosa	Silva (2014)

* Fungos não identificados

2.2 Produção de inóculo fúngico

A influência dos COVs produzidos por diferentes fungos associados à podridão da madeira foi avaliada sobre os patógenos fúngicos, *C. pteridis* e *R. solani*. Para isso, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos para meio de BDA, incubados por aproximadamente 6 dias, a 25°C. Para indução da esporulação de *C. pteridis* a cultura em BDA foi submetida a estresse físico (GRAÇA et al., 2009). Para preparo do inóculo as colônias foram raspadas com alça de Drigalski em água destilada e esterilizada, posteriormente a suspensão foi filtrada em gaze e a concentração foi ajustada para 2×10^4 conídios/mL.

Para *R. solani*, o isolado foi cultivado em meio BDA, incubado a 25°C por 4 dias. Após seu crescimento, discos do micélio foram transferidos para 50 mL de meio líquido ML (20g de extrato de malte, 2g extrato de levedura /1L de água), em frascos de Erlenmeyers de 125 ml de capacidade e incubados por 4 dias a 25°C. A massa micelial foi coletada e lavada três vezes com água destilada esterilizada, sob vácuo. Após remoção do excesso de água por prensagem manual em papel-filtro, a massa micelial foi utilizada no preparo da suspensão de inóculo. Posteriormente, o micélio foi triturado na presença de água deionizada esterilizada (0,25g/ml) com auxílio de liquidificador por um período de 3 minutos. Os isolados foram então armazenados por dois processos distintos, o primeiro foi em glicerol 15% na temperatura de -80°C e o segundo em Castellani (CASTELLANI, 1939) a temperatura ambiente.

2.3 Produção de inóculo bacteriano

Foram utilizados os isolados de *X. axonopodis* e *R. solanacearum* obtidos de folhas e do tronco de eucalipto com sintomas, respectivamente. Inicialmente os isolados foram mantidos em solução salina a 0,85% e

armazenados em glicerol a -80°C . Para o preparo do inóculo, as bactérias foram semeadas em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), em placas de Petri, incubadas a 28°C . Após 48 horas incubadas adicionou-se solução salina (NaCl 0,85%) às placas e as colônias puras foram raspadas com auxílio de uma alça de Drigalsky. A suspensão bacteriana obtida foi ajustada para 540nm com auxílio de um espectrofotômetro, equivalente à concentração de 2×10^9 ufc/ml (SOUZA, 1993).

2.4 Seleção *in vitro* de isolados fúngicos associados à madeira quanto a produção de COVs tóxicos a *Calonectria pteridis* e *Rhizoctonia solani*.

Para a avaliação da atividade dos COVs na inibição do desenvolvimento dos conídios de *C. pteridis* e crescimento micelial de *R. solani*, no teste *in vitro* foi empregada a técnica do tubo SUPELCO descrita por Barros et al. (2014) com modificações. Nos tubos (SUPELCO® SPME de 80x28 mm) foram adicionados 15 mL de ágar-água e sobre ele mais 6 mL de BDA em seguida foi introduzido um microtubo esterilizado de 1,5 mL até a metade no meio BDA. Dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro, dos fungos associados a podridão da madeira, foram retirados das bordas das colônias e foram depositados em posições opostas sobre o meio de cultura BDA e em seguida, cada tubo foi fechado com tampa rosqueada revestida, internamente, por uma película em silicone ligando a tampa ao frasco, garantindo vedação. Os tubos foram incubados em câmara de crescimento a 25°C por um período de seis dias. Como testemunha utilizou-se de tubos contendo apenas meio de cultura.

Para atividade dos COVs sobre a germinação dos conídios de *C. pteridis*, seis dias após a produção dos COVs, uma suspensão de 2×10^4 conídios/mL de *C. pteridis* foi introduzida no microtubo, contido no interior do

tubo Supelco, com uma seringa. Ao retirar a seringa, o orifício deixado foi vedado com fita adesiva para evitar a saída dos COVs e os frascos foram incubados a 25°C por um período de 8 horas. Após esse período, a suspensão de conídios foi retirada do microtubo e adicionada em Câmara de Neubauer para quantificação dos conídios germinados e não germinados em microscópio óptico. Posteriormente, foi calculada a porcentagem de conídios germinados.

Para avaliar a atividade dos COVs sobre a toxicidade à *R. solani* seis dias após a produção de COVs, uma suspensão de 0,5g/mL do micélio triturado de *R. solani* foi introduzida no microtubo com o auxílio de uma seringa. Ao retirar a seringa, o orifício foi vedado com fita adesiva e os frascos foram incubados a 25°C por 48 horas. Após esse período, no microtubo do tubo SUPELCO contendo a suspensão de micélio foi retirado uma alíquota de 10µL e inserido em um novo microtubo contendo 90µL de água deionizada esterelizada, esse procedimento foi repetido até a sétima diluição. Posteriormente foi retirada da última diluição uma alíquota de 50µL e espalhada em placa de Petri com uma alça de Drigalski e incubadas a 25°C por 24 horas. Após esse período foi quantificado o número de unidades formadoras de colônias por placa de Petri e posteriormente foi calculada a porcentagem de UFC formados.

2.5 Efeito dos COVs na toxicidade de fragmentos de micélio de *Rhizoctonia solani* em iscas de eucalipto.

De posse dos resultados do ensaio anterior, um grupo de 16 isolados (PD22, PD16, PD10, PD01, PD09, PD51, PD28, PD64, PD54, PD65, PD57, PD21, PD02, PD18, PD58, PD43) de fungos associados a podridão de madeira foram selecionados para infestação do substrato. Após infestação foram utilizadas iscas biológicas de eucalipto (MAFLA, 2004). Com o objetivo de monitorar a população do patógeno no substrato, realizou-se a quantificação por

meio do método de iscas biológicas de eucalipto (segmentos de haste de eucalipto com 2 a 2,5 cm). Para esse ensaio foram utilizadas placas de Petri contendo vermiculita, previamente esterilizada e inseridas 30 iscas de eucalipto para cada repetição, nas quais foram desinfestadas superficialmente em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio 5% e em água esterilizada. Realizou-se a infestação da vermiculita esterilizada com a suspensão de fragmentos de micélio exposta aos COVs produzidos pelos isolados associados à madeira selecionados em teste anterior e posteriormente as iscas foram inseridas na vermiculita. A testemunha não foi exposta aos COVs. As placas contendo as iscas foram incubadas a 25°C, em BOD por 48 h, após esse período as iscas foram retiradas, cuidadosamente, lavadas em água esterilizada por duas vezes para retirar o excesso de vermiculita retidas nas iscas, e semeadas em ágar-água (2%). Decorridas 24 h, avaliou-se sob microscópio estereoscópio a presença de estruturas típicas de *R. solani*.

2.6 Efeito dos COVs na infectividade de conídios de *Calonectria pteridis* em mudas de eucalipto.

Foram selecionados 13 isolados de fungos associados à madeira (PD52, PD31, PD20, PD33, PD56, PD62, PD44, PD13, PD28, PD70, PD58, PD23, PD46) os quais mostraram maior toxicidade a *C. pteridis* em testes anteriores. Empregou-se a técnica desenvolvida por Barros et al. (2014) descrita no item “2.4”. No microtubo inserido no meio de cultura foi colocado 1 mL da suspensão contendo 10^8 conídios. Após 8 horas de exposição ao COVs, a suspensão de conídios foi para 2×10^7 conídios/mL.

Mudas de eucalipto (híbrido *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*) com 70 dias de idade foram transplantadas para sacos de plástico com capacidade de 1 kg de substrato. Para o preparo do substrato (Tosprato®) foram adicionados,

aproximadamente, 100 g de NPK (4-14-8) e 50 gramas de MAP para cada 25 kg de substrato. Após 30 dias do transplante das mudas, suspensão de 2×10^7 conídios/mL, tratados com COVs, foram pulverizados com auxílio de um borrifador manual nas mudas de eucalipto. Após a inoculação as mudas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas a 25 °C. Após esse período quantificou-se o número de lesões por folha. Como testemunha utilizou-se uma suspensão de conídios não expostos aos COVs.

2.7 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis à *Xanthomonas axonopodis* e *Rasltonia solanacearum*.

Para verificação da atividade de COVs sobre o crescimento de *X. axonopodis* e *R. solanacearum*, após seis dias de crescimento dos fungos decompositores de madeira dentro do tubo SUPELCO, uma suspensão bacteriana de 2×10^9 ufc/mL foi introduzida no microtubo com o auxílio de uma seringa. Ao retirar a seringa o orifício deixado foi vedado com fita adesiva e os frascos foram incubados em BOD a 25°C por 48 horas. Após esse período o microtubo, contendo a suspensão bacteriana, foi retirado do tubo SUPELCO e foram feitas nove diluições de um volume de 100µL utilizando-se a técnica de microgota (ROMEIRO, 2001). Posteriormente as diluições, adicionaram-se 10 µl das quatro últimas diluições da suspensão bacteriana em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKET, 1970). Após 24h foi quantificado o número de unidades formadoras de colônias formadas (UFC).

2.8 Delineamento experimental e análise dos dados

Para os ensaios *in vitro* com *C. pteridis*, *R. solani*, *X. axonopodis* e *R. solanacearum* foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC),

composto por 44 tratamentos, para o primeiro ensaio e 36, 26 e 24 respectivamente, representados pelos isolados de fungos associados à madeira mais uma testemunha. Cada tratamento foi composto de quatro repetições, sendo que cada unidade amostral era constituída por um microtubo com o agente patogênico inserido em um tubo supelco. A análise dos dados foi realizada com o uso do programa Sisvar versão 4.6 (FERREIRA, 2004). Foi realizada a análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas e diferenciadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de significância.

Para os ensaios *in vivo* para *R. solani* e *C. pteridis* foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), o primeiro composto por 16 tratamentos selecionados em teste *in vitro*, com cinco repetições, cada unidade experimental foi composta de uma placa de Petri com 30 iscas de hastes de eucalipto. O teste com *C. pteridis* foi realizado com seis isolados (tratamentos) compostos por cinco repetições e uma testemunha. Para a análise dos dados utilizou-se o programa Sisvar versão 4.6 (FERREIRA, 2004) e as médias de cada tratamento foram diferenciadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de significância.

2.9 Identificação dos isolados fúngicos associados à podridão de madeira

2.9.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada para dois isolados fúngicos (PD57, PD15 e PD64) que demonstraram os melhores resultados. Os demais isolados foram identificados anteriormente (PIMENTA, 2013; SILVA, 2014). Para a extração do DNA genômico dos isolados, a massa micelial foi produzida em frascos contendo 200 mL de meio líquido (20 g de extrato de malte/ 1L de água) após a transferência de quatro discos de micélio e mantidos sob agitação a 150 rpm por 4 dias, a temperatura ambiente. Após esse período, o micélio foi

filtrado, seco e mantido a 20 °C até o momento da extração. Para a extração do DNA dos isolados fúngicos selecionados utilizou-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante.

2.9.2 Amplificação e purificação

Os fragmentos da região gênica ITS (*internal transcribed spacer*) foram amplificados com auxílio do termociclador MyCycler™ ThermalCycler e utilizando-se o Kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®). Para cada reação de PCR, utilizaram-se 2 µl de DNA genômico, 1,4 µl mM de cada primer ITS1 (*forward*; 5'-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3') e ITS4 (*reverse*; 5'-TTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990), 25 µl de tampão 1x contendo taq polimerase (Promega®). Cada volume da reação foi ajustado com 20,2 µl de água ultrapura sendo o volume final de 50 µl. A PCR foi conduzida com alternância temperatura, primeiramente a desnaturação a 85 °C por 2 min, logo após 35 ciclos a 94 °C por 95s, seguida da temperatura de 52 °C por 60s, 72 °C por 60s e a 95 °C por 70 s. E finalmente a extensão final a 72 °C por 15 min. Os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose colorido com GelRed™. Os produtos de PCR foram purificados usando o Kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System de acordo com a recomendação do fabricante.

2.9.3 Análises dos fragmentos da região ITS

O sequenciamento da região ITS foi realizado no Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Para a edição das

sequencias, utilizou-se o programa SeqAssem versão 2007/2008. Comparou-se as sequencias da região ITS com outras sequencias depositadas no GenBank (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2014) por meio da ferramenta BLAST e utilizou-se a porcentagem de similaridade em relação às sequências já depositadas no Genbank para identificação parcial dos isolados.

3. RESULTADOS

3.1 Toxicidade de COVs fúngicos a conídios de *Calonectria pteridis*.

Dos 43 isolados fúngicos associados à madeira, 39 causaram redução significativa no número de conídios germinados variando de 32 a 86% em comparação com o controle ($P \leq 0,05$). Os isolados foram agrupados em quatro e um desses grupos composto por quatro isolados não diferiram da testemunha (Figura 1) de acordo com o teste de Scott e Knott (1974).

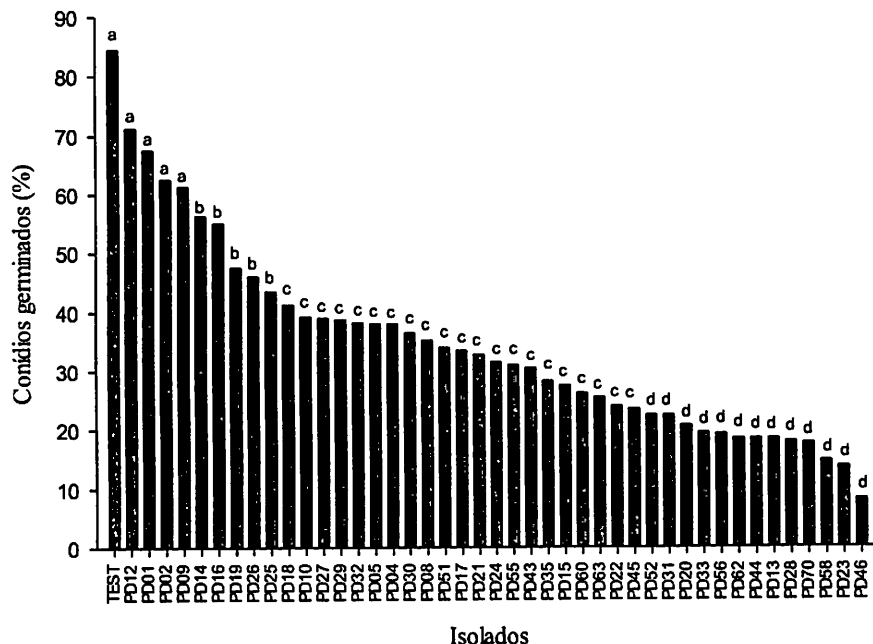


Figura 1 Porcentagem média de conídios germinados de *Calonectria pteridis* submetidos aos COVs de diferentes isolados de fungos associados a madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de significância. TEST= Controle

O primeiro grupo foi composto por 13 isolados (PD46, PD23, PD58, PD70, PD28, PD13, PD44, PD62, PD56, PD33, PD20, PD31, e PD52) e causou redução na germinação dos conídios, com variação de 72 a 86%, enquanto que o segundo grupo, composto por 21 isolados (PD45, PD22, PD63, PD60, PD15, PD35, PD43, PD55, PD24, PD21, PD17, PD51, PD08, PD30, PD04, PD05, PD32, PD29, PD27, PD10 e PD18), variou de 52 a 68%. O terceiro grupo formado por cinco isolados (PD25, PD26, PD19, PD16 e PD14) causou inibição da germinação de conídios de 32 a 43%. Quatro isolados de fungos associados à madeira em decomposição (PD09, PD02, PD01 e PD12) não diferiram da testemunha ($P \leq 0,05$).

3.2 Infectividade de conídios de *Calonectria pteridis* após exposição aos COVs fúngicos de madeira em mudas de eucalipto.

Os sete isolados fúngicos (PD13, PD20, PD28, PD31, PD44, PD56 e PD58) testados foram divididos em dois grupos de fungos que reduziram significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). O primeiro grupo composto por quatro isolados (PD31, PD28, PD13 e PD56) emitiram COVs que reduziram a capacidade infectiva de *C. pteridis*, após a exposição. Esses isolados reduziram o número de lesões nas folhas de eucalipto de 16% a 90% sendo o isolado PD31 o mais eficaz na redução lesões/folha ($P \leq 0,05$) em relação à testemunha (Figura 2). O número médio de lesões variou de 1,5 a 12,8 lesões/folha, enquanto que a testemunha apresentou 15,2 lesões/folhas.

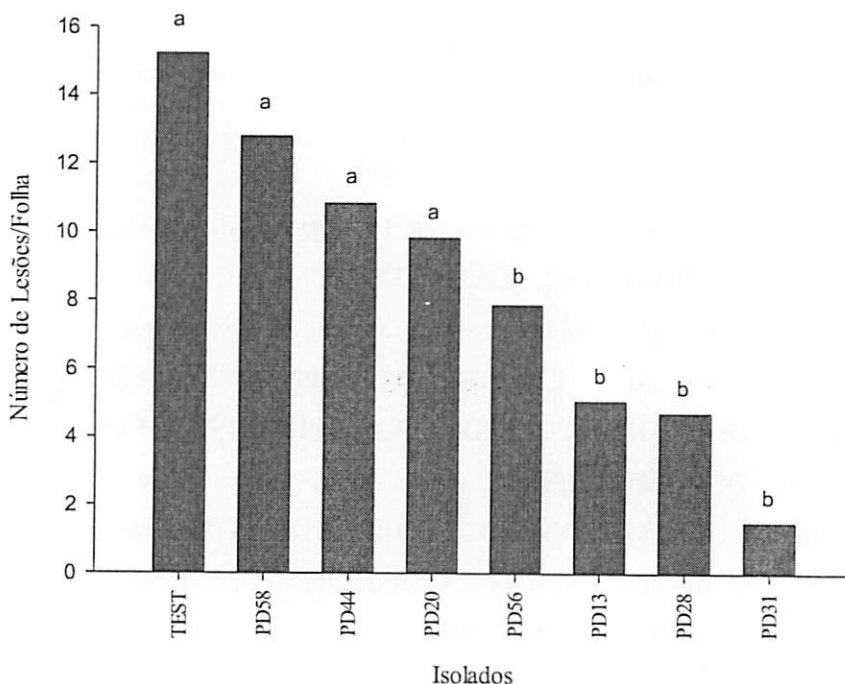


Figura 2 Número médio de lesões por folha de eucalipto, inoculadas com suspensão de conídios de *Calonectria pteridis* submetidos aos COVs de sete isolados de

fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott de 5% de significância. TEST= Controle

3.3 Toxicidade de COVs de isolados fungicos associados a madeira a fragmentos de micélio de *Rhizoctonia solani* expostos a eles.

Todos os fungos associados à madeira testados emitiram COVs que reduziram, significativamente, o número de colônias de *R. solani*, após exposição a eles. Verificou-se a formação de cinco grupos que diferiram da testemunha pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

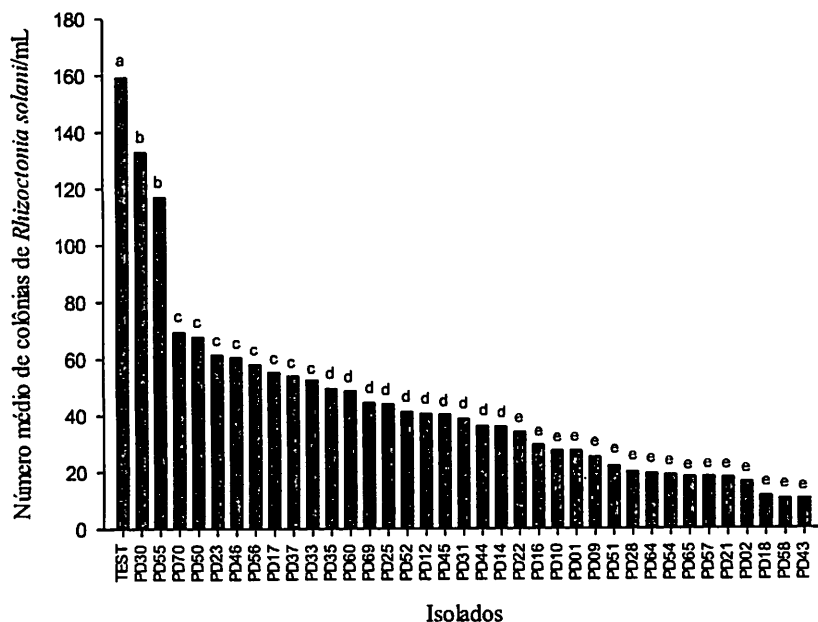


Figura 3 Número médio de colônias de *Rhizoctonia solani* submetidos aos COVs de diferentes isolados de fungos associados a madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. TEST= Controle

O primeiro grupo composto por 16 isolados (PD43, PD58, PD18, PD02, PD21, PD57, PD65, PD54, PD64, PD28, PD51, PD09, PD01, PD10, PD16 e PD22) apresentou de 78,6 a 93,4 % de redução no número de colônias de micélio de *R. solani*. A redução do número de colônias do segundo grupo, composto por 10 isolados (PD14, PD44, PD31, PD45, PD12, PD52, PD25, PD69, PD60 e PD35), variou de 69 a 77,4%. O terceiro grupo formado por oito isolados (PD33, PD37, PD17, PD56, PD46, PD23, PD50 e PD70) que variou de 56,4 a 67 % e o quarto grupo composto por dois isolados de fungos associados à madeira em decomposição (PD55 e PD30) reduziu o número de colônias de 16,5 a 27 %, em relação à testemunha.

3.4 Colonização de iscas biológicas por *Rhizoctonia solani* após exposição aos COVs de fungos associados a madeira.

Doze isolados fungicos associados a madeira emitiram COVs que reduziram, significativamente, o número de iscas de eucalipto colonizadas por *R. solani* após a exposição aos seus COVs (Figura 4). Formaram-se três grupos que diferiram da testemunha pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

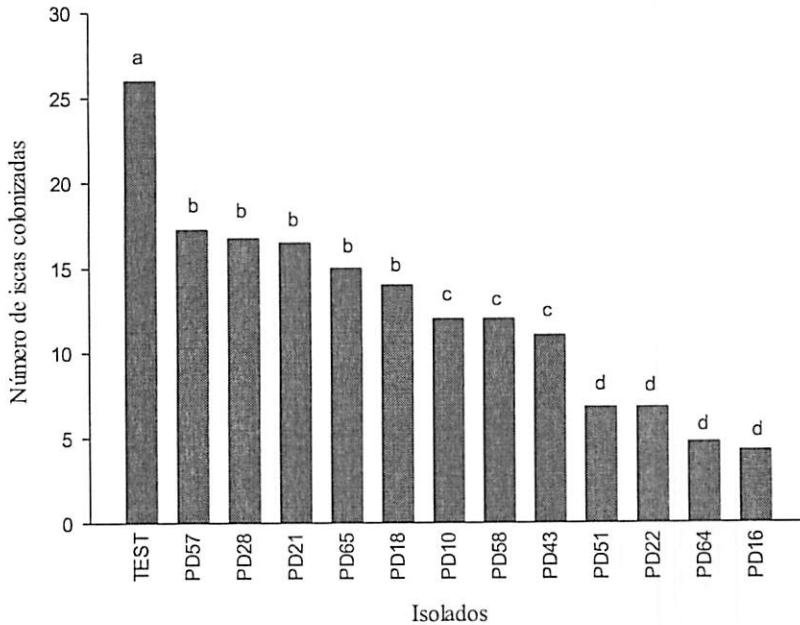


Figura 4 Número médio de iscas de eucalipto, colonizadas com por *Rhizoctonia solani* submetidos aos COVs de seis isolados de fungos associados a madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott ($P < 0,05$).

O primeiro grupo composto por quatro isolados (PD16, PD64, PD22 e PD51) foi o que apresentou uma maior redução na colonização do número de iscas contaminadas em relação à testemunha. O número médio de iscas contaminadas variou de 4,8 a 17,3 iscas/placa, enquanto que a testemunha apresentou 26 iscas/placa reduzindo em 42,5 a 84%.

3.5 Toxicidade de COVs de isolados fúngicos associados a madeira à *Xanthomonas axonopodis*.

Os COVs emitidos por todos os isolados fúngicos associados à madeira reduziram de forma significativa o crescimento de unidades formadoras de

colônia (u.f.c) de *X. axonopodis*. Após exposição por 48 horas aos COVs observou-se uma variação no crescimento bacteriano de 41,5 a 94% formando três grupos, sendo que o isolado PD43 causou a maior redução (Figura 5).

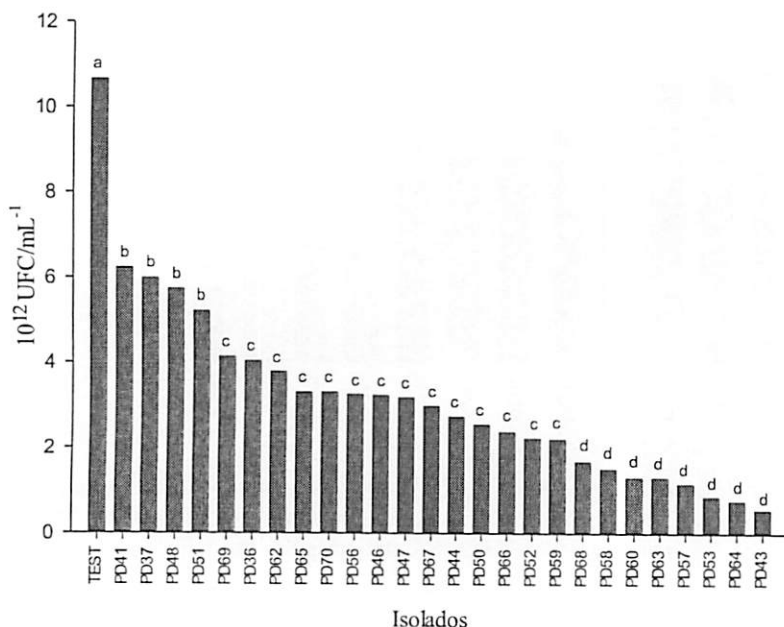


Figura 5 Número médio de UFC de *Xanthomonas axonopodis* após exposição aos COVs de diferentes isolados de fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. TEST= Controle.

O primeiro grupo composto por oito isolados (PD43, PD64, PD53, PD57, PD63, PD60, PD58 e PD68) apresentou de 84 a 94% de redução no número de colônias bacterianas em relação à testemunha. A redução do número de colônias do segundo grupo, composto por 14 isolados (PD59, PD52, PD66, PD50, PD44, PD67, PD47, PD46, PD56, PD70, PD65, PD62, PD36, e PD69), variou de 61 a 79%. O terceiro grupo formado por quatro isolados (PD51, PD48, PD37 e PD41) que variou de 41,5 a 51,5% em relação à testemunha ($P \leq 0,005$).

3.6 Toxicidade de COVs fungicos a *Ralstonia solanacearum*.

O número de UFC de *R. solanacearum*, após exposição por 48 horas aos COVs dos fungos de podridão de madeira reduziu, significativamente, em relação à testemunha. Observou-se a formação de seis grupos (Figura 6) de isolados que diferiram da testemunha pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

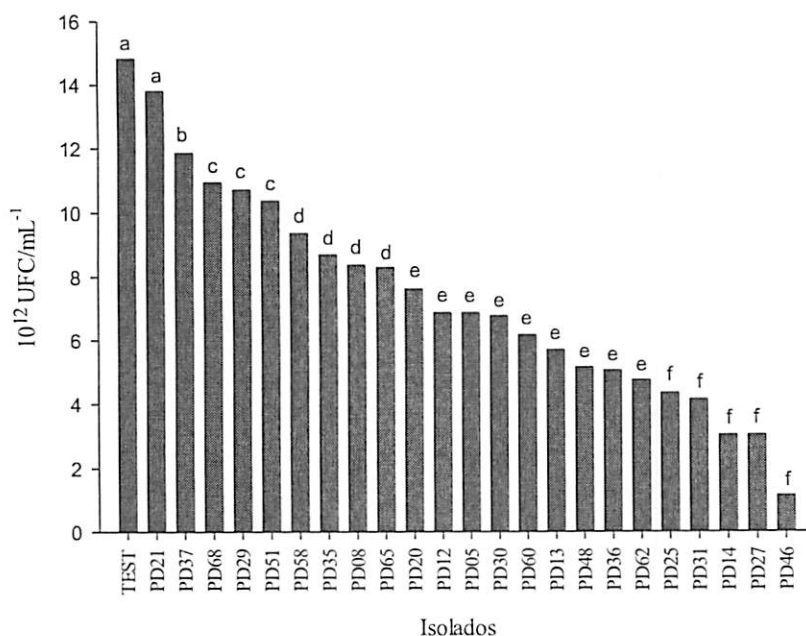


Figura 6 Número de UFC de *Ralstonia solanacearum* formadas após exposição aos COVs de diferentes isolados de fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. TEST= Controle.

O primeiro grupo composto por cinco isolados (PD46, PD27, PD14, PD31 e PD25) apresentou de 70,8 a 92,4% de redução no número de colônias bacterianas em relação à testemunha. A redução do número de colônias do segundo grupo, composto por nove isolados (PD62, PD36, PD48, PD13, PD60, PD30, PD05, PD12 e PD20), variou de 48,7 a 68%. O terceiro grupo formado por quatro isolados (PD65, PD08, PD35 e PD58) que variou de 37 a 44%. O

quarto grupo formado por três isolados (PD51, PD29 e PD68) variou de 26 a 30%. O isolados PD21 e PD37 apresentaram uma redução de 7 e 20% em relação à testemunha, respectivamente.

3.7 Identificação molecular dos isolados fungicos associados à madeira.

Foram obtidas sequencias de tamanho aproximado de 650 pb para os dois isolados selecionados. Os isolados foram identificados, parcialmente, como pertencente à classe fúngica dos basidiomicetos de acordo com a maior similaridade (99%) com outras sequencias depositadas no Genbank foram *Annulohyphoxylon* sp., *Daldinia* sp. e *Pestalotiopsis* sp. para PD57, PD64 e PD15, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

A redução na germinação dos conídios de *C. pteridis* e a inibição no crescimento micelial de *R. solani* observada no presente trabalho foi influenciada significativamente pelos COVs produzidos pelos diferentes fungos associados à madeira. Neste estudo, constatou-se uma maior eficácia dos fungos da família Ganodermataceae. Fungos dessa mesma família demonstraram grande potencial como fonte para a obtenção de substâncias com propriedades antimicrobianas (ANKE et al., 1980; SUAY et al., 2000). Espécies como *Marasmius alliaceus* (Tricholomataceae) e *M. scorodonius* foram isolados os compostos alliacolide escorodonina, respectivamente que inibem o crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (ANKE et al., 1980, 1981).

O efeito inibitório da germinação de conídios por COVs também foi demonstrada por Robinson, Mckee e Thompson (1989) onde a liberação de trimetilamida, um composto orgânico que possui um forte odor, produzido por *Geotrichum candidum*, inibiu a germinação de conídios e o crescimento de hifas. Em outros estudos, metabólitos obtidos das culturas de fungos de alguns Basidiomicetes como *Favolaschia* e *Aleurodiscus mirabilis* foram demonstradas atividades antifúngicas, sendo seletivos contra fungos zigomicetos, principalmente, contra *Mucor miehei* (BENEDICT; BRADY, 1972; ZJAWIONY, 2004).

Relatos na literatura sobre a influência de compostos orgânicos voláteis são limitados e as respostas são variáveis. As mudanças físico-químicas geradas pelo acúmulo de solventes na membrana plásmatica podem afetar a organização e estabilidade da bicamada lipídica (IGRAM; BUTTKE, 1984; SEWARD et al., 1996). Além disso, pode ocorrer perda de metabólitos essenciais e alterações no controle do pH interno (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995) e redução

da atividade de enzimas associadas à membrana (VELD et al., 1991). Como consequência, a viabilidade do microrganismo é afetada.

No presente trabalho, constatou-se que os COVs produzidos por fungos associados à madeira apresentou ação fungistática e inibiu a infecção de conídios impedindo a penetração e/ou a colonização de *C. pteridis*, reduzindo o número de folhas lesionadas em mudas de eucalipto. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos no ensaio *in vitro* onde a exposição dos conídios aos COVs dos isolados de fungos associados à madeira impediu a germinação dos conídios de *C. pteridis*. Em estudos com COVs, Bruce et al. (2003) verificaram que quando produzidos por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* em meio triptona de soja inibiram entre 76% e 33% o crescimento de fungos manchadores de madeira.

Todos os isolados selecionados neste estudo em teste *in vitro* apresentou potencial na redução da colonização de *R. solani* em iscas de eucalipto, evidenciando a possibilidade da utilização de moléculas para o tratamento de substratos. Em estudos com *Muscodor albus* os compostos voláteis naftaleno, ácido propanóico e 3-metil-1-butanol foram associados à atividade biológica sobre os fitopatógenos *Pythium ultimum*, *R. solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A utilização de misturas artificiais demonstrou a necessidade da presença dos três compostos para manutenção da atividade inibitória, indicando a sinergia entre os diferentes componentes da mistura (ERZA; HESS; STROBEL, 2004).

A redução do crescimento das colônias bacterianas, após exposição aos COVs também foi demonstrada por Pimenta (2013) que trabalhando com seleção de fungos associados a madeira que produzem COVs, verificou que os mesmos são tóxicos a *X. axonopodis* reduzindo o número de colônias formadas em até 75%. Rosa et al. (2003) em trabalho com a seleção de diferentes extratos de fungos basidiomicetos, presentes em ecossistemas brasileiros, detectaram a atividade antimicrobiana de diversos metabólitos secundários. O gênero

Ganoderma fornece substâncias antibacterianas com seletividade contra Gram-positivos. As ganomicinas das espécies *G. lucidum*, *G. pfeifferi* e *G. resinaceum*, são particularmente ativas contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* e *S. aureus* (SUAY et al., 2000; ZJAWIONY, 2004).

Mello et al. (2012), ao avaliarem a inibição de *X.vesicatoria* por COVs produzidos por fungos saprófitas coletados na região semi-árida nordestina, observaram que todos os fungos saprófitas exerceram inibição do crescimento bacteriano por meio de compostos voláteis, destacando-se *Dictyochaeta simplex*, *Gonytrichum chlamydosporium*, *Stachybotrys globosa* e *Curvularia inaequalis* que apresentaram inibições de 53,9, 54,7, 59,5 e 60,9%, respectivamente, sendo que o fungo *Volutella minima* apresentou-se como o mais promissor por apresentar controle da bactéria, estatisticamente superior aos demais com inibição de 77,6%.

Diante do exposto, os estudos com COVs de fungos associados à podridão da madeira podem ser considerados promissores para controle de diversos patógenos. Não existem relatos na literatura de trabalhos que envolvam a bioprospecção de moléculas contra patógenos florestais. Estudos adicionais deverão ser, cuidadosamente, conduzidos para determinar o potencial dos fungos utilizados neste estudo, principalmente os isolados das espécies *Ganoderma* sp. (PD58, PD70, PD44 e PD46) e as espécies de *Pestalotiopsis* sp. (PD28, PD56, PD20, PD52, PD10 e PD16) em relação aos metabólitos produzidos pelos mesmos para o controle de doenças agrônômicas e florestais. Além disso, é importante identificar as principais moléculas dos COVs envolvidas nos efeitos encontrados nesse estudo. A busca de moléculas voláteis produzidas por fungos associados à madeira viabiliza a possibilidade de se encontrarem, no mercado, análogos comerciais com potencial para serem empregados como controle de fitopatógenos de importância econômica.

5. CONCLUSÕES

Os COVs produzidos por fungos associados à madeira reduzem a germinação de conídios de *C. pteridis* em até 86%.

Todos os isolados selecionados reduziram a infecção de *C. pteridis* em mudas de eucalipto.

Os COVs produzidos por fungos associados à madeira são tóxicos a *R. solani* reduziram o número de colônias em até 93,4%.

Todos os isolados selecionados apresentaram potencial no controle de *R. solani* em substrato testado com iscas de eucalipto.

Os COVs produzidos por fungos associados à madeira foram tóxicos a *X. axonopodis* reduzindo o número de unidades formadoras de colônias em até 94%.

Os COVs produzidos por fungos associados à madeira foram tóxicos a *R. solanacearum* reduzindo número de unidades formadoras de colônias em até 92,4%.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500 p.

ANKE, T. et al. Antibiotics from Basidiomycetes: X Scorodonin, a new antibacterial and antifungal metabolite from *Marasmius scorodonius* (Fr.) Fr. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 33, p. 463-467, Feb. 1980.

ANKE, T. et al. Antibiotics from Basidiomycetes: XIII the Alliicola A and B from *Marasmius alliaceus* (Jacq. ex Fr.) Fr. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 34 p. 1271-1277, 1981.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico ABRAF 2013: ano base 2012**. Brasília, 2013. 142 p.

BARROS, A. F. et al. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucunapruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 34-43, Feb. 2014.

BENEDICT, R. G.; BRADY, L. R. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 61, p. 1820-1821, 1972.

BRUCE, A. et al. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 51, p. 101-108, Mar. 2003.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 225, p. 65-72, 1939.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 25, n. 5, p. 417-440, Sept. 2006.

ERZA, D.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. **Microbiology**, Reading, v. 150, n. 12, p. 4023-4031, Dec. 2004.

FERREIRA, D. F. **Sisvar versão 4.6**. Lavras: DEX/UFLA, 2004. 32 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Planted forests in sustainable forest management: a statement of principles**. Rome, 2009. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 44, p. 321-328, Dec. 2012.

GONÇALVES, R. C. et al. Etiologia da mancha foliar bacteriana do eucalipto no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 180-188, June 2008.

GRAÇA, R. N. et al. Factors influencing infection of eucalypts by *Cylindrocladium pteridis*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 5, p. 1-11, Oct. 2009.

GU, Y. Q. M. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 2567-2575, May 2007.

INGRAM, L. O.; BUTTKE, T. M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 253-300, 1984.

KADO, C. J.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 60, n. 2, p. 969-976, 1970.

MAFIA, R. G. **Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto**. 2004. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

MELLO, F. E. et al. Inibição de *Xanthomonas vesicatoria* por compostos voláteis produzidos por fungos sapróbios. **Tropical Plant Pathology**, Manaus, v. 38, p. 487, ago. 2012. Suplemento.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

PIMENTA, L. **Compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos associados à madeira em decomposição e tóxicos a patógenos de importância florestal e agrônômica**. 2013. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROBINSON, P. M.; MCKEE, N. D.; THOMPSON, L. A. A. Autoinhibition of germination and growth in *Geotrichum candidum*. **Mycological Research**, London, v. 93, n. 2, p. 214-222, Sept. 1989.

ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 279 p.

ROSA, L. H. et al. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 967-974, out. 2003.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 2, p. 507-512, Sept. 1974.

SEWARD, R. et al. The effects of ethanol, hexan-1-ol, and 2-phenylethanol on cider yeast growth, viability, and energy status; synergistic inhibition. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 102, n. 2, p. 439-443, Nov. 1996.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

SILVA, B. N. S. **Seleção de fungos apodrecedores de madeira e caracterização de basidiomicetos associados à podridão de tecidos de árvores vivas**. 2014. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade federal de Lavras, Lavras, 2014.

SOUZA, R. M. **Cianogênese na interação mandioca - *Xanthomonas campestris* pv. manihots e sensibilidade de fitobactérias a cianeto**. 1993. 94 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1993.

SUAY, I. et al. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 129-140, Aug. 2000.

VELD, G. I. et al. Hydrophobic membrane thickness and lipid-protein interactions of the leucine transport system of *Lactococcus lactis*. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, Amsterdam, v. 1065, p. 203-212, 1991.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 357-364, Aug. 2002.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

ZJAWIONY, J. K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, n. 2, p. 300-310, Feb. 2004.