



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS DE GURUPI  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E  
BIOTECNOLOGIA

**ALESSANDRA MACEDO BARROS**

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE  
SUCUPIRA BRANCA NO CONTROLE ALTERNATIVO  
DO MAL-DO-PANAMÁ NA CULTURA DA BANANA E  
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Gurupi/TO  
2019

**ALESSANDRA MACEDO BARROS**

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE  
SUCUPIRA BRANCA NO CONTROLE ALTERNATIVO  
DO MAL-DO-PANAMÁ NA CULTURA DA BANANA E  
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Gurupi, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Talita Pereira de Souza  
Ferreira

Gurupi/TO  
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

B277u Barros, Alessandra Macedo.  
UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SUÇUPIRA BRANCA NO  
CONTROLE ALTERNATIVO DO MAL-DO-PANAMÁ NA CULTURA DA  
BANANA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO. / Alessandra Macedo Barros. –  
Gurupi, TO, 2019.  
41 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus  
Universitário de Gurupi - Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia,  
2019.

Orientador: Talita Pereira de Souza Ferreira

1. Fungos endofíticos. 2. Óleo essencial. 3. Mal-do-panamá. 4. Controle  
biológico. I. Título

**CDD 660.6**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de  
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.  
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do  
Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com  
os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

ALESSANDRA MACEDO BARROS

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SUCUPIRA  
BRANCA NO CONTROLE ALTERNATIVO DO MAL-DO-  
PANAMÁ NA CULTURA DA BANANA E POTENCIAL  
BIOTECNOLÓGICO**

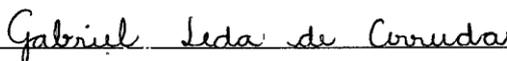
Monografia foi avaliada e apresentada à UFT –  
Universidade Federal do Tocantins – Campus  
Universitário de Gurupi, Curso de Engenharia de  
Bioprocessos e Biotecnologia para obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos  
e Biotecnologia e aprovada em sua forma final  
pelo Orientador e pela Banca Examinadora

Data de aprovação: 19 / 06 / 2019

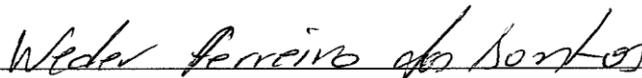
Banca Examinadora



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Talita Pereira de Souza Ferreira, UFT



Prof. Ms. Gabriel Leda Arruda, UFT



Prof. Dr. Weder Ferreira dos Santos, UFT

Gurupi, 2019

*Primeiramente a Deus, por mais um sonho realizado, por todo cuidado e proteção no decorrer dessa longa caminhada, por sempre me mostra o lado bom de todos os obstáculos encontrados, por sempre me fazer florescer no lugar que estou, independentemente da situação.*

*A Deus eu dedico essa conquista, sem ELE, ela não teria vindo.*

*Em especial a minha mãe Doraci de Macedo, ao meu pai Adeivaldo Pereira, e aos meus irmãos Gustavo Macedo e Izaias de Macedo, que sempre estiveram comigo, me apoiando nessa caminhada. Essa conquista também é de você.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela bondade, cuidado e proteção, no decorrer de toda essa caminhada. Até aqui me ajudou o Senhor. Sem Ele eu nada seria. Minha eterna Gratidão a Ti. A Deus toda Honra e Glória. Agradeço aos meus pais, Doraci e Adeuvaldo, pela paciência e cuidado mesmo a quilômetros de distância, sempre estiveram muito presentes em cada etapa da minha vida. Motivando-me a nunca desistir dos meus sonhos, me ensinando que quando se tem Fé em Deus, tudo se torna possível, mesmo numa caminhada longa e árdua. Amo vocês, minha família, minha base.

Aos meus irmãos Gustavo Macedo e Izaias de Macedo, que sempre estiveram ao meu lado, me dando apoio, me fazendo acreditar que os meus sonhos se tornariam realidade. A minha avó Maria Lobo de Macedo por todo carinho e cuidado em oração.

Aos meus amigos que conquistei no decorrer da faculdade e quero levar pra vida toda, sempre estiveram comigo, Flávia Luane, Ana Karoliny, Ramylla Rizzia, Gabriella Cristina, e Ronan Cristhian. Não poderia esquecer da Amanda, Mariana, Hollavo, e a minha prima Giselda, grande amiga. A todos muito obrigada por fazerem parte da minha caminhada.

De forma muito especial, quero agradecer a Prof<sup>ª</sup> Dra. Talita Pereira de Souza Ferreira, que sempre me orientou de forma maravilhosa, com muito carinho, foi professora, foi/é amiga. Nunca mediu esforços para me ajudar, jamais ouvi um não dessa pessoa maravilhosa, ao lado dela, cresci como pessoa, como profissional e principalmente como ser humano, desconheço um ser igual a ela. Quero que você Talita, saiba que contribuiu grandemente na minha vida, desde quando eu a conheci. Você foi o anjo que Deus colocou aqui na Universidade Federal do Tocantins, para me mostrar que ainda há pessoas boas nesse mundo, amo muito você, obrigada flor, de coração.

E de forma muito gratificante, quero agradecer ao laboratório de Fitopatologia, pelo apoio durante esses três anos de pesquisa, e oportunidade. Em especial ao Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos, que depositou total confiança no meu trabalho, e sempre mostrou o melhor caminho a ser trilhado. A Dalmácia, uma pessoa muito querida, sempre disposta a ajudar a todos, que Deus abençoe você “Dal”. E a todos que fazem parte da equipe do laboratório de fitopatologia, muito obrigada pelo apoio e carinho.

A UFT, pela oportunidade no desenvolvimento da pesquisa, e reconhecimento por meio de apresentações em congressos. Ao CNPq, pelo apoio com a bolsa, no decorrer de todo o desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigada.

E por fim ao pai da Física, professor Chrystian de Assis, que sempre que precisei, não mediu esforços em me ajudar, com os cálculos, físicas e matemáticas. Muito obrigada, o senhor também contribui na minha caminhada.

## RESUMO

A banana (*Musa* sp.) é uma fruta de origem asiática, pertence à família Musaceae. É rica em vitaminas do tipo A, B e C, minerais, e abundante em carboidratos, proteínas, gorduras possuindo baixo teor calórico. Tem grandes aplicações na indústria alimentícia, na produção de sorvete, *shake*, bolacha integral, doces. A farinha da fruta verde, é utilizada na fabricação de pão integral, bolos e *Browne* integral. Uma das principais doenças que atacam a cultura da banana no Brasil, influenciando diretamente na produtividade é o mal-do-panamá, causado pelo fungo fitopatogênico *Fusarium* sp. Como controle alternativo, tem se usado agentes microbianos, extratos vegetais, extratos fúngicos e óleos essenciais, como agentes fungicidas. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial de inibição dos fungos endofíticos da sucupira branca (*Pterodon emarginatus*) e óleo essencial das sementes de sucupira frente ao fungo fitopatogênico *Fusarium* sp. E avaliar o estímulo da produção de fitoalexinas na cultura do sorgo e na cultura da soja, utilizando extrato de fungos endofíticos como tratamento. Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata, selecionando 15 endofíticos, utilizou-se placas de Petri de 8 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA. Foram colocados dois discos em lados opostos da placa de Petri, um contendo micélios do fungo endofítico e o outro contendo micélios do fungo fitopatogênico, incubadas em BOD a 28 °C em fotoperíodo de 12 horas. Como controle, utilizou-se água destilada e um disco de micélios de *Fusarium* sp. Para o tratamento com óleo essencial de sucupira na indução de fitoalexinas, cinco concentrações foram testadas (50.000, 10.000, 5.000, 2.500 e 1.250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e extratos fúngicos apenas. No antagonismo, 9 fungos endofíticos apresentaram resultados satisfatórios, sendo que os fungos Pe5a claro e Pe5a escuro sobrepôs 100% o patógeno. Para os ensaios realizados com óleo da sucupira branca, a % de inibição foi de 80 % dos esporos do fungo *Fusarium* sp. Na produção de fitoalexinas no sorgo e na soja o extrato Pe2d, foi o que apresentou melhor resultado, sendo maior que o controle positivo Biozyme®. No sorgo, usando o óleo essencial não houve valor máximo obtido. Na soja o valor máximo obtido foi na concentração de (50.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados obtidos foram bons, o que despertou aprofundar-se em estudos e pesquisas voltadas a biotecnologia, para outros fins economicamente viáveis.

**Palavras-chaves:** Fungos endofíticos. Óleo essencial. Mal-do-panamá. Controle biológico.

## ABSTRACT

The banana (*Musa* sp.) Is a fruit of Asian origin, belongs to the family Musaceae. It is rich in vitamins type A, B and C, minerals, and abundant in carbohydrates, proteins, fats possessing low caloric content. It has great applications in the food industry, in the production of ice cream, shake, whole wafer, sweets. The green fruit flour, is used in the manufacture of whole wheat bread, cakes and whole Browne. One of the main diseases that attack the banana crop in Brazil, directly influencing productivity is the pan-mal, caused by the phytopathogenic fungus *Fusarium* sp. As an alternative control, microbial agents, plant extracts, fungal extracts and essential oils have been used as fungicidal agents. Therefore, the present work aimed to evaluate the potential inhibition of endophytic fungi of sucupira (*Pterodon emarginatus*) and essential oil of sucupira seeds against phytopathogenic fungus *Fusarium* sp. And to evaluate the stimulus of phytoalexin production in the sorghum culture and in the soybean crop, using endophytic fungi as a treatment. In vitro experiments were performed in triplicate, selecting 15 endophytes, 8 cm diameter Petri dishes containing BDA culture medium. Two discs were placed on opposite sides of the Petri dish, one containing endophytic mycelia and the other containing mycelium of the phytopathogenic fungus, incubated in BOD at 28 ° C in a 12-hour photoperiod. As control, distilled water and a disk of mycelium of *Fusarium* sp. For treatment with sucupira essential oil in induction of phytoalexins, five concentrations were tested (50,000, 10,000, 5,000, 2,500 and 1,250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and fungal extracts only. In the antagonism, 9 endophytic fungi presented satisfactory results, with the Pe5a clear and dark Pe5a fungi overlapping the pathogen 100%. For the tests performed with white sucupira oil, the% inhibition was 80% of the spores of the fungus *Fusarium* sp. In the production of phytoalexins in sorghum and soybean the Pe2d extract was the one that presented the best result, being greater than the positive control Biozyme®. In sorghum, using the essential oil there was no maximum value obtained. In soybean the maximum value obtained was in the concentration of (50,000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The results obtained were good, which led to a deepening of studies and research focused on biotechnology, for other economically viable purposes.

**Key-words:** Endophytic fungi. Essential oil. Mal-do-panama. Biological control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Planta bananeira ( <i>Musa</i> sp.) .....	15
Figura 2	Colônias de <i>Fusarium</i> spp. em meio batata-dextrose-ágar(A), conidióforo (B).....	16
Figura 3	Bananeira com sintomas do ataque de mal-do-panamá (A); Pseudocaule com sintomas do ataque de mal-do-panamá (B).....	17
Figura 4	Fungo endofítico Pe7a (A), Fungo endofítico Pe5a (B), Fungo endofítico Pe6a (C).....	28
Figura 5	Antagonismo in vitro do endofítico Pe6a e Pe6b sobre o fitopatógeno <i>Fusarium</i> sp.....	29
Figura 6	Testes de inibição da germinação e conídios do <i>Fusarium</i> sp. usando (A) óleo essencial da sucupira branca e (B) extratos de fungos endofíticos associados de sucupira branca.....	30
Figura 7	Produção de fitoalexinas 3-deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo usando (A) óleo essencial da sucupira branca e (B) extratos de fungos endofíticos associados de sucupira branca.....	31
Figura 8	Produção de gliceolina em cotilédones de soja (A) usando óleo da sucupira branca (B) usando extratos de fungos endofíticos associados de sucupira branca.....	32

## LISTA DE TABELAS

Figura 1	Classificação dos terpenos baseada na quantidade de unidades de isopreno, com os respectivos exemplos.....	19
Figura 2	Constituintes do óleo essencial das folhas de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, Fabaceae.....	21
Figura 3	Fungos endofíticos isolados das folhas de Sucupira branca.....	28
Figura 4	Avaliação do antagonismo <i>in vitro</i> para determinação da atividade antibiótica.....	29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
3.1 Cultura da Banana .....	16
3.2 O fungo <i>Fusarium</i> sp .....	17
3.3 Doença mal-do-panamá .....	18
3.4 Controle alternativo.....	19
3.5 Óleo essencial de sucupira branca.....	20
3.6 Fungos endofíticos .....	22
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
4.1 Isolamento dos fungos endofíticos.....	25
4.2 Extração do óleo essencial de Sucupira Branca.....	25
4.3 Isolamento dos fungos utilizados nos bioensaios.....	25
4.4 Determinação da frequência de colonização .....	26
4.5 Determinação da atividade antibiótica (pareamento dos fungos) .....	26
4.6 Preparação dos extratos dos fungos endofíticos.....	26
4.7 Preparo das soluções para as atividades biológicas .....	27
4.8 Testes de inibição da germinação de conídios e análises estatísticas .....	27
4.9 Produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo.....	27
4.10 Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja.....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são fungos e bactérias que vivem no interior das plantas. habitam partes aéreas, como folhas e caules, até então sem causar danos aos seus respectivos hospedeiros. Os endófitos podem se diferenciar dos microrganismos fitopatogênicos por não serem prejudiciais às plantas, e nem lhes causar doenças aparentes (ARAÚJO et al., 2012).

Fungos endofíticos tem despertado grande interesse biotecnológico, devido à vasta biodiversidade da flora brasileira. Assim, estes fungos vêm se destacando pelo seu potencial de eliminar patógenos causadores de severas doenças. Por meio da ação de metabólitos sintetizados pelos fungos endofíticos, o controle alternativo tem se tornado eficaz. Não causam danos ao meio ambiente e a saúde humana, quando comparados aos agrotóxicos usados em grande escala atualmente (CORREIA et al., 2015; SANTOS; VARALLO, 2011).

Segundo Oliveira et al., (2014) as espécies fúngicas do gênero *Trichoderma* e *Clonostachy*, tem demonstrado ser viável no controle de fitopatogênicos e eficientes no biocontrole da vassoura de bruxa do cacauero, através da produção de antibióticos antifúngicos e principalmente por apresentarem potencial para crescer endofiticamente em tecidos verdes sem causar danos ao hospedeiro.

A cultura da banana (*Musa spp*), constitui-se em atividade agrícola importante para o Brasil e estado do Tocantins, proporcionando retorno econômico para o produtor. Depois da laranja a banana é a segunda fruteira com maior cultivar no Brasil. o extremo norte do estado do Tocantins é considerado o maior produtor da fruta (ALMEIDA, 2016).

Como toda cultura, a bananeira também é afetada por patógenos, os quais são causadores de muitos prejuízos aos agricultores. Dentre as doenças, o mal do Panamá, doença inicialmente observada em Piracicaba (São Paulo) em 1930, é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. O patógeno se estabelece nos tecidos hospedeiros através do sistema radicular, principalmente através das raízes secundárias, alcançando, posteriormente, o xilema (ALMEIDA, 2016). Para tanto, a fim de minimizar os riscos da doença, outras medidas de controle devem ser implementadas.

Além do que atualmente já é feito, incluindo a utilização de mudas saudáveis, o controle de nematoides e da broca do rizoma, uma vez que esses podem contribuir para o incremento do mal do Panamá, o controle alternativo e biológico por meio de fungos endofíticos e óleo essencial, faz-se necessário (TAIZ et al., 2017; TORRES et al., 2018). Outro fator importante é a determinação dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, bem como a sua atividade

elicitora (fitoalexinas) ou antimicrobiana podendo ser uma alternativa eficaz no controle de doenças.

Observando assim, o modo de ação das fitoalexinas sobre fungos fitopatogênicos. As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, sendo considerada um dos principais mecanismos de defesa das plantas. Estando diretamente associada à prevenção da infecção causada por patógenos (MATIELLO et al., 2016). Logo, é importante entender a influência dos fatores bióticos e abióticos nesse processo de defesa das plantas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar fungos endofíticos das folhas de sucupira branca (*Pterodon emarginatus*), bem como avaliar o potencial dos mesmos de maneira a desenvolver meios alternativos e eficazes de controle da doença do mal-do-panamá causada pelo fungo fitopatogênico *Fusarium* sp. Além disso, uma modelagem matemática será desenvolvida para avaliar o crescimento da população fúngica no progresso da doença.

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar fungos endofíticos das folhas e caule da sucupira branca (*Pterodon emarginatus*);
- Avaliar o potencial de inibição dos fungos endofíticos frente ao fungo fitopatogênico *Fusarium* sp;
- Extrair o óleo essencial da semente de sucupira branca (*Pterodon emarginatus*) e avaliar o seu potencial na germinação de conídios do fitopatógeno *Fusarium* sp.
- Avaliar o estímulo da produção de fitoalexinas na cultura do sorgo e gliceolina na cultura da soja, utilizando extrato de fungos endofíticos como tratamento.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cultura da Banana

A banana (*Musa* sp.) é uma fruta de origem asiática, classe Monocotyledoneae, ordem Scitaminales e pertence à família Musaceae. É uma fruta rica em vitaminas do tipo A, B e C, além de minerais, tais como, cálcio, potássio e ferro, abundante em carboidratos, proteínas, gorduras possuindo baixo teor calórico (PINHEIRO et al., 2018). A bananeira é um vegetal herbáceo constituído por sistema radicular, caule subterrâneo conhecido popularmente como rizoma, pseudocaule, folhas, flores e frutos. Por ser uma espécie de clima tropical, a bananeira é cultivada em todas as regiões do Brasil (BEZERRA, 2019).

Figura 1 - Planta bananeira (*Musa* sp)



Fonte: Adaptado RAMPAZZO, 2014.

Segundo dados do IBGE (2017), a banana é a segunda fruta mais produzida no Brasil, sendo classificada em quinto lugar no ranking mundial. A safra anual 2017, foi de aproximadamente 6,675 milhões de toneladas, com área colhida de 465,434 mil hectares e rendimento médio de 14 mil kg/ha<sup>-1</sup>. No ano de 2017 o Tocantins contribuiu com uma área plantada de 2.496 ha com produção de 24.030 toneladas e rendimento de 9,63 ton/ha. Dessa forma, a bananeira é considerada uma cultivar promissora, pois gera emprego e mão de obra auxiliando na economia do país.

A fruta *in natura* é consumida por toda população brasileira, tem grandes aplicações na indústria alimentícia, sendo utilizada para a produção de sorvete, *shake*, bolacha integral, doces, dentre outros. A fruta ainda verde pode ser processada para a obtenção da farinha, utilizada na fabricação de pão integral, bolos e *Browne* integral (ANDRADE et al. 2017).

Embora a produção de banana seja elevada, como toda cultura sujeita a doenças, a bananeira também é afetada por patógenos, que causam grandes perdas na produção. Dentre as doenças o enfoque do trabalho é voltado ao mal-do-panamá, doença causada na bananeira pelo fungo *Fusarium* sp.

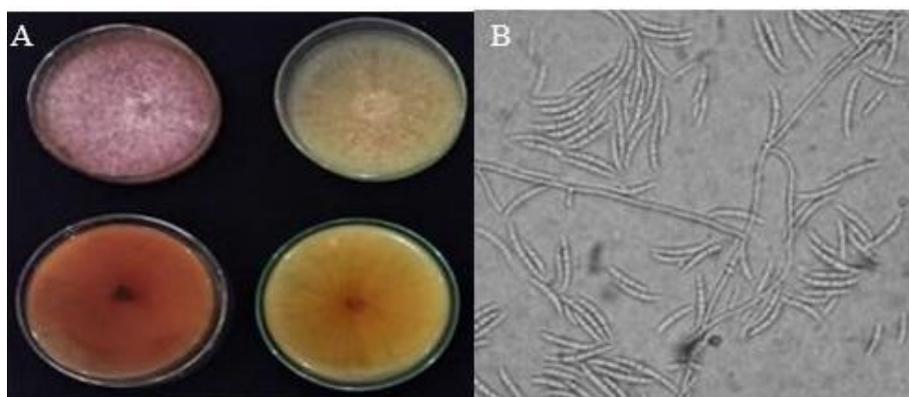
### 3.2 O fungo *Fusarium* sp.

Os fungos do gênero *Fusarium* são responsáveis pela perda de várias cultivares no Brasil, e no mundo (SÁ et al., 2019). As espécies fitopatogênicas mais comuns dentro do gênero *Fusarium* são, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. oxysporum*, e *F. verticillioidis*. Atualmente a posição taxonômica pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae, e Gênero *Fusarium* (CHAGAS JÚNIOR et al., 2018).

Os fungos do gênero *Fusarium* tem como características o crescimento rápido da colônia, com micélio aveludado à levemente cotonoso. Sendo incubado a 25°C por sete a dez dias, o fungo pode apresentar pigmentação do micélio que varia de cor, rosa, púrpura, cinza ou amarela. E para a determinação dessas espécies o meio de cultivo mais utilizado é o Batata Dextrose Ágar (BDA) (SÁ et al. 2019).

A morfologia principal deste gênero é caracterizada na forma de foice de seus conídios. Os quais emergem de células conidiogênicas localizadas na extremidade das hifas e podem apresentar-se isoladamente ou agrupados em massas crescendo diretamente do micélio (MELO et al., 2010).

Figura 2 – Colônias de *Fusarium* spp. em meio batata dextrose ágar (A) conidióforo (B)



Fonte: Adaptado BARRETO, 2018; WALKER et al., 2016

Os fungos deste gênero são considerados fungos cosmopolitas, pois causam escurecimento vascular de diferentes plantas, murcha, desfolhação, tombamento, podridão de raiz e morte da planta (DEAN et al., 2012). Essas espécies de fungos são as principais responsáveis por perdas significativas nas cultivares brasileira.

Os fungos do gênero *Fusarium* apresentam alta capacidade de sobrevivência na ausência de um hospedeiro, e isso só é possível devido a estruturas de resistências que o fungo apresenta denominadas como clamidósporos (ALMEIDA, 2016).

### 3.3 Doença mal-do-panamá

O mal-do-panamá é um problema fitossanitário causado pelo fungo *Fusarium* sp., agente casual da doença na bananeira. A doença teve seu primeiro registro no ano de 1930, em Piracicaba cidade de São Paulo, onde influenciou na perda de 1 milhão de pés de banana maçã num período de 4 anos (ALMEIDA, 2016).

As bananeiras infectadas pelo fungo *Fusarium* sp. apresentam sintomas de amarelecimento e murcha foliar, seguido de secagem das folhas que formam um modelo de guarda-chuva fechado. No pseudocaule ou rizoma é perceptível a descoloração vascular que apresenta manchas vermelhas que identificam a presença do fitopatógeno (FERNANDES et al., 2006).

Figura 3- Bananeira com sintomas do ataque de mal-do-panamá (A), Pseudocaule com sintomas de ataque do mal-do-panamá



Fonte: Adaptado FERNANDES et al., 2006

Alguns produtos químicos são utilizados para o controle dessa doença, porém, o produto só é eficaz quando aplicado de forma preventiva (CHAGAS JÚNIOR et al., 2018). Dessa forma há algum tempo a solução encontrada como controle efetivo do mal-do-panamá, é a utilização de clones e cultivares tolerantes a essa enfermidade, ou seja, plantas melhoradas por meio da cultura de células vegetais, que geram plantas livres de doenças e fitopatógenos (BORGES et al., 2007).

### **3.4 Controle alternativo**

Atualmente tem se utilizado produtos alternativos a fim de controlar pragas, e doenças causadas por fungos, bactérias, vírus, protozoários e nematoides, que atacam culturas economicamente importantes e que sejam sustentáveis (MORANDI et al., 2008).

O controle alternativo tem como objetivo controlar e evitar as doenças causadas nas lavouras, de forma que não venha causar prejuízo a biodiversidade, o meio ambiente e principalmente a saúde do ser humano. Quando comparados aos agrotóxicos que são amplamente utilizados atualmente e geram resíduos tóxicos que contaminam o solo e as plantas, atinge a saúde do agricultor, dependendo do tempo de uso, além de tornar os patógenos resistentes a sua aplicação (RUFINO et al., 2018).

Os métodos alternativos utilizados são, agentes microbianos, extratos vegetais, extratos fúngicos e óleos essenciais, estes que têm sido relatados na literatura como agentes fungicidas. Logo, a utilização desses agentes de origem natural tem como característica controlar ou inibir o desenvolvimento de doenças (RUFINO et al., 2018).

Segundo Francisco et al., (2012) os produtos naturais derivados de plantas apresentam ação antimicrobiana, ao atuar sobre o patógeno. Esse fator está diretamente relacionado aos metabólitos secundários que funcionam como indutores de resistência, que atuam ativando os mecanismos de defesa da planta através de moléculas bioativas como bioestimulantes do crescimento da planta.

O controle alternativo é um método sustentável de proteção ao meio ambiente, e apresenta como vantagens, baixo custo, recuperação de solos contaminados, fácil aplicação, além de não deixarem resíduos no meio ambiente, o que é característica do uso de agrotóxicos.

### 3.5 Óleo essencial de sucupira branca

Atualmente são conhecidas aproximadamente 3.000 espécies de plantas que sintetizam óleos essenciais, sendo que 300 são comercialmente importantes, aplicados na indústria farmacêutica, alimentícia, agropecuária, sanitária, cosmética e de perfumes (SILVA et al., 2015).

Desta forma, os óleos essenciais têm sido uma alternativa bastante estudada quanto a sua utilização no controle alternativo de microrganismos patogênicos, devido as suas propriedades de defesa que são oferecidas a planta de acordo com a sua composição química (RUFINO et al., 2018).

Os óleos essenciais são compostos voláteis, devido ao seu alto ponto de ebulição produzidos pela planta, podendo ser extraídos de flores, folhas, casca de frutos, e sementes. Possuem aroma ou odor, característica que varia de acordo com as diferentes espécies (GOULART et al., 2018).

Os óleos essenciais ou metabólitos secundários vegetais têm como principal função oferecer à planta, proteção contra infecções fúngicas, viroses, bacterioses, e herbívoras, atuam, repelindo ou atraindo outros organismos e apresenta ação de resistência a estresses ambientais (TAIZ et al., 2017). Os principais constituintes químicos encontrados nos óleos essenciais são os derivados dos compostos terpênicos, como os monoterpênicos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ) e os fenilpropanoides (MIRANDA et al., 2016).

Tabela 1- Classificação dos terpenos baseada na quantidade de unidades de isopreno, com os respectivos exemplos.

Classificação	Bloco de isopreno	Quantidade de carbono
Hemiterpenos	1	5
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	40
Politerpenos	>8	>40

Fonte: Adaptado FELIPE; BICAS, 2017

Os terpenóides constituem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo classificados de acordo com o número de carbonos, presente em sua estrutura (CUNHA, 2018). Apesar de apresentarem diferenças estruturais entre si, todos os terpenóides são basicamente estruturados em blocos de cinco carbonos, unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), ligadas entre si (FELIPE; BICAS, 2017).

Contudo a composição química dos óleos essenciais está diretamente relacionada com fatores abióticos e genéticos. Os fatores abióticos são, temperatura, pluviosidade, nutrição, luminosidade, período de coleta, pois o aroma característico de cada planta está diretamente relacionado com o horário de coleta e a época do ano escolhida também influencia (PAULUS et al., 2016). Já os fatores genéticos que influenciam na composição química do óleo essencial, está diretamente relacionado com as interações planta/microrganismos, planta/planta, e planta/insetos, outro fator importante é a idade e o período de desenvolvimento da planta (ALCANTARA et al., 2018).

A sucupira branca (*Pterodon emarginatus*) é uma espécie arbórea, da família Fabaceae, nativa do cerrado brasileiro, e destaca-se pela importância medicinal e florestal apresentada na cultura brasileira (SANTOS et al., 2010). Todas as partes da planta são utilizadas na medicina popular, desde as raízes, frutos e folhas, estas que são indicadas principalmente no tratamento do diabetes, e reumatismo, além de atuar como anti-inflamatório (GALCERAN et al., 2011).

Segundo Santos et al., (2010) na década de 90 pesquisas comprovaram que o óleo da semente de espécies Fabaceae do gênero *Pterodon* se mostrou altamente eficaz no controle da mosca-do-chifre (*Hematobia irritans*).

De acordo com estudos fitoquímicos com o objetivo de avaliar as propriedades químicas presentes no óleo extraído da semente da sucupira branca, foi possível observar a presença de monoterpenos, diterpenos, isoflavonas e sesquiterpenos, tais como:  $\delta$ -elemeno,  $\beta$ -elemeno, trans-cariofileno,  $\beta$ -gurjunene,  $\alpha$ -humuleno,  $\gamma$ -Murolene, germacreno-D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e acetato de cisfarnesil. Esses compostos apresentam ação anti-reumática, anti-inflamatória e analgésica. Dessa forma tem se despertado interesse em desenvolver estudos para avaliar o potencial da atividade antifúngica apresentada por essas propriedades encontrada no óleo essencial da sucupira branca (DUTRA et al., 2012).

Tabela 2- Constituintes do óleo essencial das folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae

IR	Constituintes	Teor (%)
1376	$\alpha$ -copaeno	1,07
1390	B-elemento	7,10
1419	<i>E</i> -cariofileno	6,73
1454	$\alpha$ -humuleno	2,48
1479	$\gamma$ -muroloeno	48,79
1500	biciclogermacreno	22,66
1497	acifileno	7,41

IR: Índice de retenção; Rendimento: 2%

Fonte: Adaptado SANTOS et al., 2010.

### 3.6 Fungos endofíticos

Os microrganismos endofíticos são fungos e bactérias que habitam em plantas sem oferecer nenhum dano ao seu hospedeiro. Segundo a literatura, a estimativa é que exista cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo apenas 90 mil espécies catalogadas (AZEVEDO, 2014).

Contudo, para cada planta hospedeira é possível isolar uma ou mais espécies de endófitos, estes podem ser divididos em dois grupos: no grupo (1) encontram-se aqueles que não geram estruturas externas a partir do hospedeiro, já o grupo (2) são aqueles capazes de desenvolver estruturas externas, tais como nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos (PAMPHILE et al., 2017).

Esses microrganismos possuem uma ação importante entre planta e microrganismo, de modo a atuar na defesa da planta, ou seja, é uma interação mutualística, onde o vegetal oferece nutrientes e proteção para o fungo. Em troca, o fungo ou bactéria proporciona compostos químicos, como enzimas, alcaloides e antibióticos fazendo com que a planta tenha maior resistência em ambientes de estresse causado por fatores abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico) e fatores biológicos (inseto, herbívoros, micro-organismos) (TORRES et al., 2018).

Diante dessa interação os endófitos são capazes de produzir substâncias de interesse biotecnológico, possivelmente devido a interações metabólicas com seu hospedeiro (KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2013). Nos últimos anos, estudos demonstraram que os fungos endofíticos são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários

bioativos, conhecidos apenas em plantas, um exemplo é a produção do Taxol um fármaco importante utilizado no tratamento de câncer, produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*, que também produz esta substância (CHAPLA et al., 2012).

Na agricultura podem ser utilizados como promotores de crescimento de plantas ou agentes de controle biológico de patógenos, por meio da produção de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como, enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteroides. Produzindo ainda, fito hormônios, toxinas, antibióticos e outros fármacos, oferecendo maior resistência às condições de estresse nas plantas. Diversos outros campos, como no processamento de alimentos, na fabricação de detergentes, de tecidos, de produtos farmacêuticos, gerando assim produtos de interesse biotecnológico (SANTOS; VARAVALLO, 2011)

Com isso tem-se despertado um grande interesse científico por produtos naturais originados de fungos endofíticos pelo fato destes apresentarem nova fonte de biomoléculas ativas de estrutura única e com grande atividade biológica, que tem despertado interesse na indústria farmacêutica, agricultura e na biotecnologia (LUNARDELLI et al., 2016).

Diante da necessidade de diminuir o uso de insumos agrícolas (fungicidas e inseticidas), estes que apresentam alta toxicidade ao homem durante a aplicação e gera resíduos que contaminam os alimentos e o meio ambiente, como solos e lençóis freáticos, faz se necessário a busca científica por novas medidas de biocontrole (TALAPATRA et al., 2017).

Os fungos endofíticos quando utilizados no biocontrole, podem atuar como microparasitas produzindo enzimas como as  $\beta$ -1,3 glucanases e quitinases que atuam na degradação da parede celular do fungo parasita e assim, conseguem extrair os nutrientes do hospedeiro (TORRES et al., 2018). Outro fator importante é a antibiose, na antibiose, os endófitos produzem compostos antifúngicos associados ao metabolismo secundário que é capaz de matar, ou inibir o crescimento e a reprodução de microrganismos fitopatogênicos (SARAIVA et al., 2014).

Contudo a utilização de microrganismos endofíticos no controle biológico de patógenos tem demonstrado resultados promissores, gerando boas perspectivas futuras, principalmente com o objetivo de diminuir o uso de produtos agroquímicos nas plantações.

### 3.7 Fitoalexinas em defesa da planta

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixo peso molecular, produzidos pela planta em resposta a algum tipo de estresse físico, químico ou biológico. Mais de 300 tipos de fitoalexinas já foram caracterizadas entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonóides, luteolinidina, apigenidina, o que é considerado com uma grande diversidade (MAZARO et al., 2008).

A produção de fitoalexinas é considerada um dos principais mecanismos de defesa das plantas, estando diretamente associada à prevenção da infecção causada por patógenos. Exemplo de fitoalexinas em algumas espécies: pisatina em ervilha, primeira fitoalexina caracterizada quimicamente, gliceolina em soja, 3- deoxiantocianidina em sorgo, faseolina em feijão e gossipol em algodão (MATIELLO et al., 2016). Inúmeras outras fitoalexinas foram obtidas de plantas cultivadas como batata, tomate, alface, arroz, cevada, banana, entre outras (BRAGA, 2007).

A determinação desses metabólitos secundários produzidos por essas plantas, bem como a sua atividade elicitora ou antimicrobiana pode ser uma alternativa eficaz de controle de doenças em cultivares como essas citadas acima.

O modo de ação das fitoalexinas sobre fungos fitopatogênicos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, resultando na inibição da germinação e na alongação do tubo germinativo e na redução ou inibição do crescimento micelial (MAZARO et al., 2008).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Isolamento dos fungos endofíticos**

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Fitopatologia do Campus de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins – TO. Os fungos endofíticos foram isolados da sucupira branca (*Pterodon emarginatus*) localizada no campus da UFT.

As folhas e o caule de sucupira branca foram coletados aos arredores da Universidade Federal do Tocantins, em período chuvoso. Suas superfícies foram lavadas em água corrente. Após, foram colocadas em imersões sucessivas com álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 2,5% (4 minutos), álcool 70% (30 segundos), seguidas de lavagem com água destilada autoclavada (6 minutos) e secadas em papel de filtro esterilizado (ARAÚJO et al., 2002). Após a lavagem foram retirados 50 µL da água destilada utilizada na assepsia do material vegetal, e adicionado em uma placa de Petri, contendo o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento dos microrganismos, com o intuito de verificar a eficiência do processo de assepsia. As folhas desinfetadas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 5 x 5 mm. Posteriormente, estes fragmentos foram inoculados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio de cultura BDA (Batata, dextrose e ágar). Ao meio de cultura foram acrescentados 50 µg/mL tetraciclina (antibiótico). Para o isolamento das culturas puras foram feitos repiques sequenciais em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura.

### **4.2 Extração do óleo essencial de Sucupira Branca**

O óleo essencial utilizado foi extraído da semente de sucupira branca localizada na região sul do município da cidade de Peixe-TO. Para a extração do óleo essencial foi empregado o método de arraste a vapor, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (Guimarães et al., 2008).

### **4.3 Isolamento dos fungos utilizados nos bioensaios**

O fitopatógeno *Fusarium* sp. foi isolado das folhas da bananeira maçã (*Musa* sp.) com sintomas da doença mal-do-panamá, sendo preparadas conforme metodologia descrita por Valadares et al., (2008). Partes da planta que apresentaram sintomas da doença foram cortadas e

lavadas em água corrente. Em seguida, foram desinfetadas superficialmente pela imersão consecutiva em etanol a 70 % por 30 segundos, solução de hipoclorito a 1 % por 40 segundos e três vezes em água destilada autoclavada. Foram transferidas com auxílio de uma pinça esterilizada para placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura BDA e 500 mg mL<sup>-1</sup> de Ampicilina. Diariamente, as placas de Petri foram supervisionadas e as colônias fúngicas, que não apresentaram contaminantes, foram repicadas em novas placas com o mesmo meio de cultura.

#### **4.4 Determinação da frequência de colonização**

A frequência de colonização das folhas e do caule foi determinada pela fórmula: FI = número de fragmentos foliares com crescimento fúngico ÷ número total de fragmentos amostrados × 100.

#### **4.5 Determinação da atividade antibiótica (pareamento dos fungos)**

A atividade antibiótica foi avaliada pela capacidade de inibição do crescimento micelial *in vitro* dos fungos endofíticos frente ao fitopatogênico *Fusarium* sp. Para tanto, utilizou-se placas de Petri de 8 cm de diâmetro contendo aproximadamente 15 mL de meio de cultura BDA. Foram colocados dois discos em lados opostos da placa de Petri, um contendo micélios do fungo endofítico e o outro contendo micélios do fungo fitopatogênico. As placas foram incubadas em BOD a 28 °C e em fotoperíodo de 12 horas.

#### **4.6 Preparação dos extratos dos fungos endofíticos**

Os conídios ou micélios dos endófitos foram inoculados em 200mL de meio pré-fermentativo (JACKSON, et al., 1993). As culturas foram incubadas inicialmente por 48 horas, sob agitação constante (120 rpm), a 30°C. Em seguida, as massas miceliais foram assepticamente coletadas por filtração a vácuo e reinoculadas em 400mL do meio fermentativo Czapek (ALVIANO, et al., 1992). Após 6 dias de incubação sob agitação constante (120 rpm) a 30 °C, os fluidos das culturas foram separados das massas miceliais por filtração a vácuo e o extrato obtido da metodologia de (DHANKHAR, et al., 2012). O sobrenadante foi utilizado a fim de verificar a bioatividade das substâncias presentes. Para as extrações, solventes orgânicos polares e apolares foram empregados com o intuito de se obter o maior número de substâncias ativas.

#### 4.7 Preparo das soluções para as atividades biológicas

Para preparar as soluções do extrato fúngico foram utilizados pequenos frascos de vidro esterilizados com tampa para receber as diferentes concentrações. Uma solução estoque foi preparada para a maior concentração. Na sequência, foi adicionado primeiramente o extrato e ajustada a concentração estoque de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  para um volume de 10 mL; em seguida, foi adicionado Tween 80 ( $0,05 \text{ mL}/100 \text{ mL}$ ). O balão foi agitado suavemente e depois foi inserida a água destilada esterilizada e após agitação foi obtida uma mistura homogênea. Posteriormente, foram realizadas as demais diluições conforme (AGUIAR et al., 2014).

#### 4.8 Testes de inibição da germinação de conídios e análises estatísticas

As mesmas concentrações dos extratos de fungos endofíticos e do óleo da sucupira branca previamente preparadas juntamente com o controle positivo, foram testadas no por um período de 62 horas para a inibição da germinação dos conídios do fungo fitopatogênico *Fusarium sp.*

#### 4.9 Produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo

Sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) foram desinfetadas em hipoclorito de sódio a 1% por 10 min, lavadas 3 vezes em água destilada e esterilizada. Em seguida, 10 sementes foram colocadas em papel de germinação e umedecidas com água destilada esterilizada durante o período de 10 dias de germinação. Assim preparados, os cartuchos com as sementes foram incubados em câmara úmida na ausência de luz a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por cinco dias. As plântulas formadas foram expostas a luz por 4 horas para paralisar a elongação dos mesocótilos (YAMAOKA et al., 1990). Desta maneira, foram obtidas plântulas com mesocótilos adequados para o bioensaio de produção de fitoalexinas.

Para o teste de avaliação do potencial provedor de fitoalexinas dos extratos dos fungos endofíticos de sucupira branca, os mesocótilos foram pulverizados com 2 mL dos extratos (Pe5a claro, Pe5a escuro, Pe2d, Pe7a e Pe6b) na concentração de  $25.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Neste ensaio, foram utilizados dois controles. Para o controle negativo foram utilizados 2 mL de água destilada esterilizada e para o controle positivo 2 mL de uma suspensão de Biozyme. O mesmo foi feito usando óleo da sucupira branca, nas concentrações de ( $50.000$ ,  $10.000$ ,  $5.000$ ,  $2.500$  e  $1.250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os mesocótilos foram mantidos em câmara úmida, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  sob luz fluorescente por um

período de 60 horas. Após esse período 3 mesocótilos por repetição foram cortados e uma porção de três cm pesada, cortada em pequenos segmentos e colocados em tubos de ensaios contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v) (STANGARLIN et al., 1999). Os segmentos fragmentados dos mesocótilos foram mantidos a 4°C em metanol por 96 horas para extração dos pigmentos (WULFF; PASCHOLATI, 1998). Os dados foram expressos em absorvância a 480 nm por grama de tecido fresco (Abs (480 nm).g.t.f<sup>-1</sup>).

#### **4.10 Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja**

Após o plantio das sementes de soja, (*Glycine max* L.) em solo esterilizado utilizando bandejas. Dez dias após, com as plântulas apresentando média de 10 cm de altura, os cotilédones foram destacados dos hipocótilos das plântulas e feito assepsia. Assim preparados, cinco cotilédones foram colocados em placa de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Sobre cada cotilédone foi aplicada uma alíquota de 100 µL dos extratos de fungos endofíticos de sucupira branca sobre uma concentração de 25.000 µg mL<sup>-1</sup>. Para os tratamentos controle foram utilizados 100 µL de água destilada estéril para o controle negativo e 100 µL de uma suspensão de Biozyme para o controle positivo. As placas contendo os cotilédones foram mantidas a 25 °C, e posteriormente os demais testes foram realizados conforme (AYERS et al., 1976). Os dados foram expressos em absorvância a 285 nm por grama de tecido fresco (Abs (285 nm).g.t.f<sup>-1</sup>).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

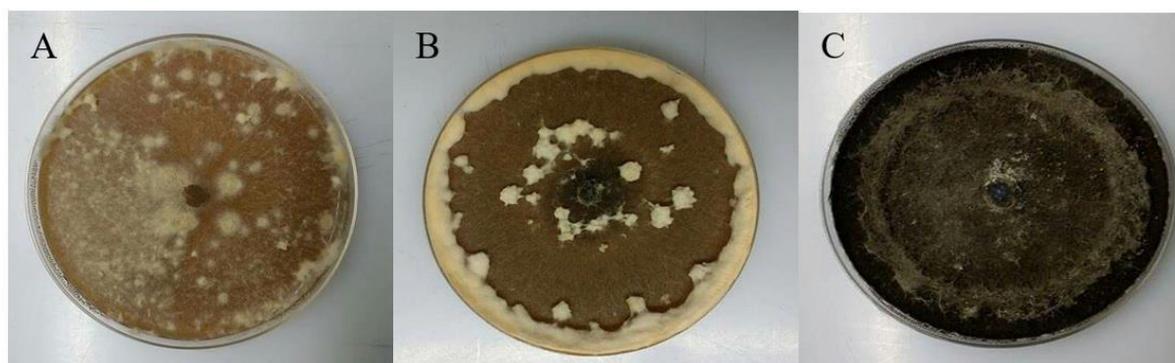
Os fungos endofíticos isolados foram nomeados com o símbolo PE, que são as iniciais da planta utilizada, seguida de um número, conforme a numeração da placa de isolamento, e acompanhada de uma letra em minúscula correspondendo à ordem com que o fungo foi isolado da mesma placa. Conforme os resultados obtidos neste isolamento, foram contados 56 fungos. Vinte e seis fungos endofíticos foram isolados das folhas de Sucupira branca de 10 placas (Tabela 3) e trinta foram isolados do caule (Tabela 3).

Tabela 3 – Fungos endofíticos isolados das folhas de Sucupira branca

Folhas		Caule	
Placa	Nomeação do Fungos	Placa	Nomeação do Fungos
1	PE1a PE1b	11	PE11a PE11b PE11c PE11d PE11f PE11g
2	PE2a PE2b PE2c PE2d	12	PE12a PE12b
3	PE3a PE3b PE3c	13	PE13a PE13b PE13c
4	PE4a PE4b PE4c	14	PE14a PE14b
5	PE5a PE5b PE5c	15	PE15a
6	PE6a PE6b	16	PE16a PE16b PE16c
7	PE7a PE7b PE7c	17	PE17a PE17b PE17c
8	PE8a	18	PE18a PE18b
9	PE9a PE9b	19	PE19a PE19b PE19c
10	PE10a PE10b PE10c	20	PE20a PE20b PE20c PE20d PE20e

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 4 - Fungo endofítico Pe7a (A), Fungo endofítico Pe5a (B), Fungo endofítico Pe6a (C)



Fonte: Dados da pesquisa

Para o fitopatógeno *Fusarium* sp., em todos os dias de incubação, o fungo cresceu com as mesmas medidas, apresentando morfologia branca aveludada na parte superior e coloração rósea na parte inferior. Após o período de incubação foi realizado o repique, para a obtenção de uma colônia pura.

O óleo da semente de Sucupira branca foi extraído com sucesso, apresentando um rendimento alto de óleo essencial, sendo posteriormente utilizado em testes de inibição.

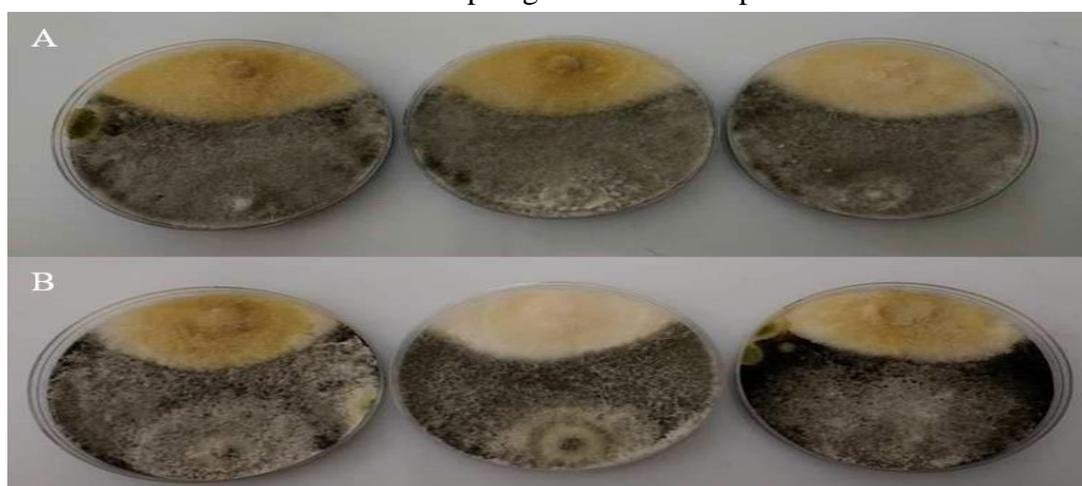
A determinação da frequência de colonização dos fungos endofíticos das folhas e dos caules da Sucupira foi significativa, obtendo 100% de crescimento fúngico. Após a colonização de toda a superfície do meio, os fungos foram repicados a fim de obter uma cultura pura para posteriores testes. Para a avaliação antagonista foram selecionados 15 fungos endofíticos. A avaliação antagonista foi pontuada numa escala de 1 - 5. Onde a classe 1, o endofítico sobrepôs 100% o patógeno cobrindo toda a superfície do meio. Na classe 2, o endofítico sobrepôs pelo menos 67% da superfície do meio, classe 3, ambos colonizaram 50% da superfície do meio. Na classe 4, o patógeno colonizou 67% da superfície do meio e aparentemente resistiu a invasão do endófito, e na classe 5, o patógeno sobrepôs 100% o endofítico ocupando toda a superfície do meio.

Tabela 4 -Avaliação do antagonismo *in vitro* para determinação da atividade antibiótica

Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Pe5a Cor Clara, Pe5a Cor Escura	Pe2a, Pe2d, Pe9b, Pe7a, Pe6a, Pe6b, Pe16a	Pe8a, Pe3b, Pe20a	Pe10c, Pe4b, Pe3a, Pe5b	-

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5 - Antagonismo *in vitro* do endofítico Pe6a (A) e Pe6b (B) sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp.



Fonte: Dados da pesquisa

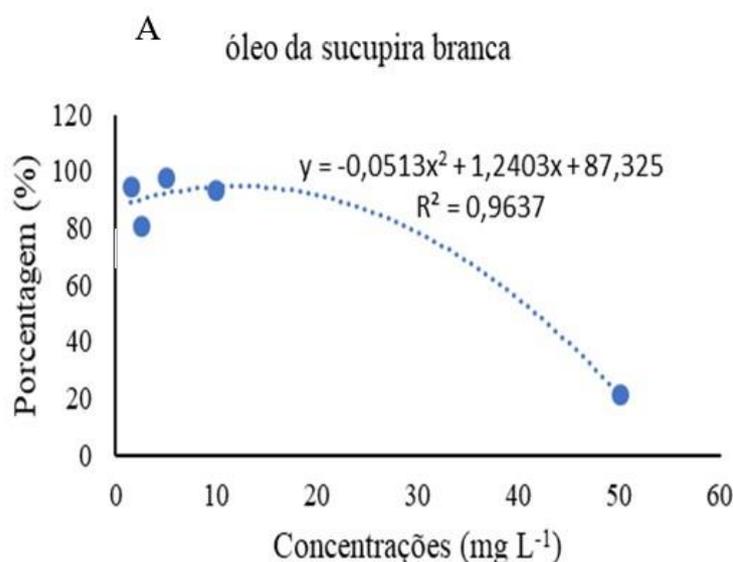
Após o teste de antagonismo, 9 fungos endofíticos apresentaram resultados satisfatórios, sendo 5 (Pe5a claro, Pe5a escuro, Pe2d, Pe7a e Pe6b) selecionados e usados para a obtenção dos extratos endofíticos. Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos dos fungos endofíticos sobre a inibição/crescimento micelial de *Fusarium* sp. os extratos foram preparados com uma única concentração de  $25.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , não houve diluição dos mesmos.

Para o óleo da sucupira branca foi preparada uma concentração estoque de  $50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e desta fez-se quatro diluições ( $10.000$ ,  $5.000$ ,  $2.500$  e  $1.250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sendo usadas com a mesma finalidade do extrato fúngico.

Segundo Hoffann e seus colaboradores (2015) foram testados 15 isolados do antagonista *Trichoderma* sp. em confronto direto com o patógeno *Fusarium* sp., onde todos os isolados apresentaram antagonismo in vitro contra o patógeno.

A figura 5 a seguir apresenta os testes de inibição da germinação e conídios utilizando o óleo da sucupira branca e os extratos dos fungos endofíticos associados a esta planta.

Figura 6-Testes de inibição da germinação e conídios do *Fusarium* sp. usando (A) óleo essencial da sucupira branca



Fonte: Dados da pesquisa

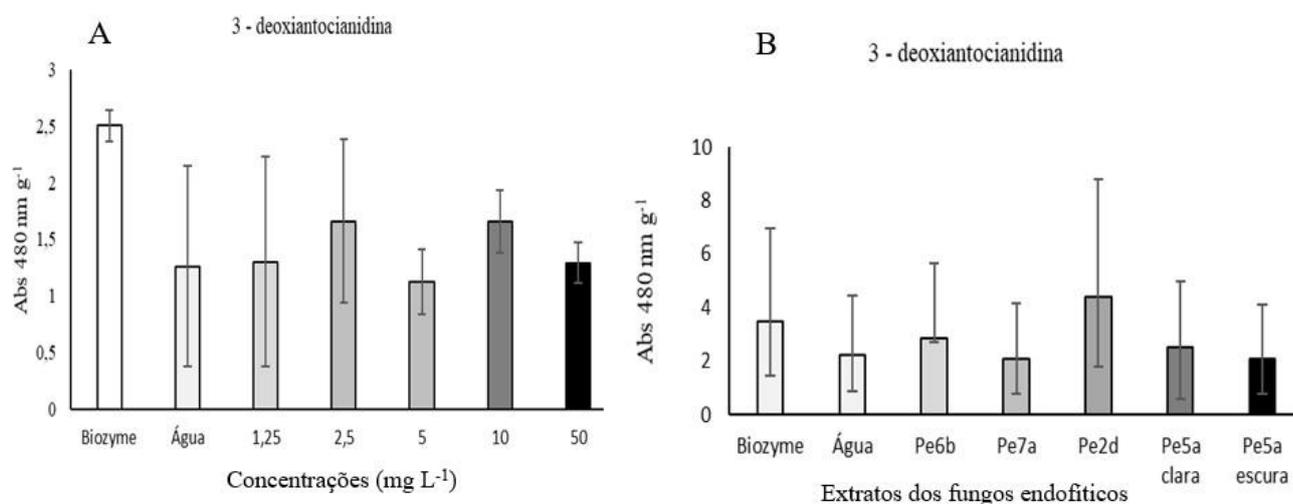
Para os ensaios realizados com óleo da sucupira branca (Figura 6A), observou-se uma % alta de inibição para todas as concentrações testadas ( $50.000$ ,  $10.000$ ,  $5.000$ ,  $2.500$  e  $1.250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), onde o valor máximo de inibição foi de 80 % dos esporos do fungo *Fusarium* sp. Apresentando 20% de germinação dos conídios.

Comparando os resultados com o trabalho de Pereira (2013), onde foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*, o óleo essencial reduziu linearmente o crescimento micelial de ambos os patógenos, obtendo assim inibição completa dos micélios.

Essa inibição linear está diretamente relacionada com os diferentes compostos majoritários presentes no óleo da sucupira, que influencia diretamente na inibição. Atuando na desorganização celular da membrana citoplasmática do fungo, impedindo assim o seu crescimento.

A figura 7 a seguir apresenta a produção de fitoalexinas no sorgo utilizando o óleo da sucupira branca e os extratos dos fungos endofíticos associados a esta planta.

Figura 7- Produção de fitoalexinas 3-deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo usando (A) óleo essencial da sucupira branca e (B) extratos de fungos endofíticos associados de sucupira branca.



Fonte: Dados da pesquisa

Para os ensaios feitos com óleo da sucupira branca na indução de fitoalexina 3-deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo (Figura 7 A), observou-se produção em todas as concentrações testadas (50.000, 10.000, 5.000, 2.500 e 1.250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Contudo, não houve valor máximo obtido para as concentrações de óleo, cujo resultado maior foi para o controle positivo Biozyme®. Dessa forma, o ativador Biozyme® gerou melhores resultados para a indução da fitoalexina 3-deoxiantocianidina.

Bonaldo et al., (2007) testou óleo essencial de *E. citriodora* nas concentrações ( $10^{-2}$ ,  $10^4$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$ ). E observou que, nessas concentrações não ocorreu efeitos indutores na síntese de fitoalexinas em sorgo. Hipoteticamente, na tentativa de conduzir o efeito fitotóxico do óleo

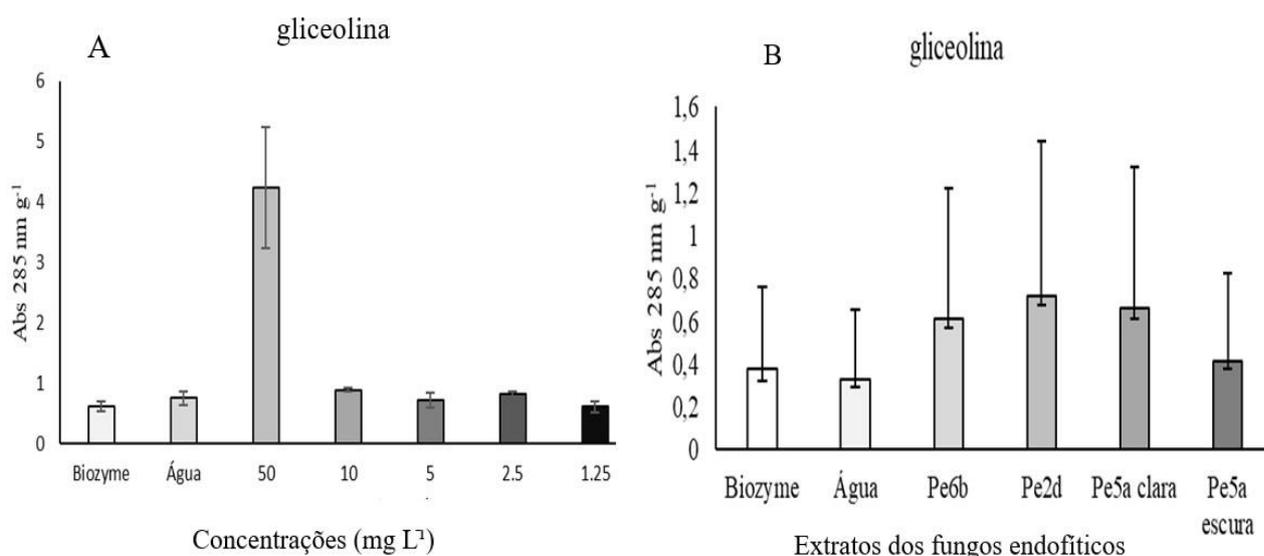
essencial sobre os mesocótilos de sorgo, tenha ocorrido a redução da atividade elicitora. Dessa forma, o autor afirma que, trabalhos futuros devem ser realizados avaliando-se novas diluições e/ou metodologias para evitar o efeito fitotóxico do óleo essencial sobre estes tecidos.

A redução da atividade elicitora nos mesocótilos de sorgo, pode ser justificada pelo alto teor de fitotoxicidade do óleo. Logo é imprescindível a realização de estudos químicos que identifiquem os compostos presentes em cada óleo e a forma que cada um deles atua nos tratamentos testados, ou seja, um estudo preventivo.

Para os ensaios usando os extratos dos fungos endofíticos da Sucupira branca na indução da fitoalexina 3-deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo (Figura 6 B), observou-se produção em todos os extratos testados (Pe6b, Pe7a, Pe2d, Pe5a clara, Pe5a escura). O valor máximo obtido foi no extrato Pe2d, cujo resultado foi maior que o controle positivo Biozyme®.

Na literatura Matiello et al., (2016) relata que em mesocótilos de sorgo, os extratos brutos aquosos de Angelim e Cambará induziram a produção das fitoalexinas 3-deoxiantocianidinas em baixas concentrações (1 e 5%), não há relatos usando o extrato da sucupira branca. Para tanto, não foram encontrados resultados semelhantes em relação ao teste com óleo da sucupira branca.

Figura 8- Produção de gliceolina em cotilédones de soja (A) usando óleo da sucupira branca (B) usando extratos de fungos endofíticos associados de sucupira branca.



Fonte: Dados da pesquisa

Para os ensaios feitos com óleo essencial da sucupira branca na indução de gliceolina em cotilédones de soja, observou-se a maior produção na concentração de  $50.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Sendo o resultado maior que o controle positivo Biozyme®. Não há relatos na literatura sobre a utilização de óleo essencial na indução de fitoalexinas na soja.

Entretanto, Bonaldo et al., (2007), utilizou extratos de folhas de *E. citriodora* e observou que não ocorreu indução de gliceolina em cotilédones de soja.

Para os ensaios feitos com extratos endofíticos da sucupira branca na indução de gliceolina em cotilédones de soja (Figura 8), observou-se produção na concentração testada ( $25.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Apresentando, indução em todos os extratos testados (Pe6b, Pe2d, Pe5a clara, Pe5a escura). Desta forma, o valor máximo obtido foi no extrato Pe2d, cujo resultado foi maior que o controle positivo Biozyme®.

Segundo Matiello et al., (2016), os resultados obtidos em seus testes, mostraram que os extratos brutos aquosos do eucalipto (*Corymbia citriodora*) são eficientes na indução de fitoalexinas do tipo gliceolina em cotilédones de soja. Assim a produção de fitoalexinas, pode ser uma alternativa viável na indução de resistência e no controle de doenças em algumas plantas cultivadas.

## 6. CONCLUSÃO

A sucupira branca (*Pterodon emarginatus*) apresenta uma fonte diversa de fungos endofíticos em seus tecidos da folha e caule, é uma ótima planta para o isolamento destes microrganismos com amplas variedades de espécies. A semente da sucupira branca (*Pterodon emarginatus*) apresentou resultado significativo na produção de óleo, o que despertou aprofundar-se em estudos e pesquisas voltadas a biotecnologia. Os endofíticos da sucupira branca apresentaram resultados significativos quanto a sua atividade antagonista sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp. Assim, os melhores endofíticos teve seu extrato selecionado para os testes de indução de fitoalexinas. O óleo essencial da sucupira apresentou resultado satisfatório na inibição da germinação dos conídios do patógeno *Fusarium* sp, Resultando em 80% de inibição. Para a produção de fitoalexinas no sorgo e na soja o extrato Pe2d, foi o que apresentou melhor resultado, sendo maior que o controle positivo Biozyme®. Dessa forma o extrato Pe2d é indicado para estudos mais aprofundados, identificando a espécie e seu metabolismo de ação.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. W. S. et al. Fumigant antifungal activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* essential oils and citronellal against three fungal species. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- ALMEIDA, N. O et al. Ocorrência de nematoides na cultura da banana no estado de Goiás e sua correlação com o mal-do-Panamá e com fatores edáficos. 2016.
- ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J.L.; MARCON J.; SOBRAL, J.K.; LAVACA, P.T. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. **CALQ**, Piracicaba, 2002.
- ALCANTARA, D. O. F et al. Teor e fitoquímica de óleo essencial de manjeriço em diferentes horários de colheita. **journal of neotropical agriculture**, v. 5, n. 4, p. 1-6, 2018.
- ANDRADE, B. A et al. Production of unripe banana flour (*Musa spp*) for application in whole wheat bread. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2017.
- ARAÚJO, A. C. O.; MUSSI, D. V.; SILVEIRA, S. F.; ROCABADO, J. M. A.; ARAÚJO, K. L. Endophytic fungi associated with medicinal plants. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.14, n.2, p.261-266, 2012.
- ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanol. *Micopathologia*, v.119, p. 17-23, 1992
- AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**. Springer, New Delhi, p. 17-22. 2014.
- AYERS, A. R et al. Interações hospedeiro-patógeno: X. Fracionamento e atividade biológica de um eliciador isolado das paredes miceliais de *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Fisiologia Vegetal**, v. 57, n. 5, p. 760-765, 1976.
- BARRETO, G. G. Caracterização morfológica de *Fusarium spp.* do feijão fava e controle biológico via sementes plântulas. **Universidade Federal da Paraíba Centro de Ciências Agrárias**, 2018.
- BEZERRA, A. E et al. Estimativa da eficiência do uso da água no cultivo irrigado da banana (*Musa sp. L.*), através de sensoriamento remoto. 2019.

BONALDO, S. M et al. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.

BORGES, S.; JAQUEIRA, A et al. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 35-41, 2007.

BRAGA, M. R. Fitoalexinas e a defesa das plantas. **Acesso em Instituto de Botânica, SMA**, São Paulo, v. 23, 2007.

CHAGAS JUNIOR, A. F. C. et al. Ação de *Trichoderma* spp. No controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Agri-environmental sciences**, v. 4, n. 2, p. 9-15, 2018.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de química**, p. 421-437, 2012.

CORREIA, V. C. S. et al. Avaliação da atividade antagônica in vitro de fungos endofíticos associados ao camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Revista de Bioenergia e Ciência Alimentar**, v. 2, n. 4, p. 201-207, 2015.

CUNHA, J. A et al. Efeito antibacteriano a óleo essencial de *Origanum hydrophila* em *Rhamdia quelen*. 2018. Tese de Doutorado. **Universidade Federal de Santa Maria**.

DHANKHAR, S.; DHANKHAR, S.; KUMAR, M.; RUHIL, S.; BALHARA, M.; CHHILLAR, A. K. Analysis toward innovative herbal antibacterial e antifungal drugs. **Recent Patents Anti-infective Drug Discovery** v. 7, p. 242-248, 2012.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DUTRA, R. C et al. Caracterização fitoquímica e citogenética das sementes de *Pterodon emarginatus* vogel. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 1, n. 2, p. 99, 2012.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-30, 2017.

FERNANDES, C. F. et al. Doenças da bananicultura: sigatoca-amarela. **Embrapa Rondônia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

FRANCISCO, W. M. Controle da antracnose do maracujazeiro amarelo com aplicação de óleo de copaíba. **Rio Branco: UFAC**, 2012.

GALCERAN, C. B. et al. Efeitos antiinflamatórios e analgésicos do ácido 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ dihidroxi-vouacapan-17 $\beta$ -óico isolado de *Pterodon emarginatus* Vogel frutas. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 139-143, 2011.

GOULART, Ana Luisa Ribeiro Martins et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial extraído da casca da laranja pêra frente às bactérias da família enterobactereacea. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 9, n. 2, p. 117-123, 2018.

GUIMARÃES, L. G. L et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) STAPF). **Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2008.

HOFFMANN, C. A.; CHAGAS, L. F. B.; SILVA, D. P.; JUNIOR, A. F. C.; SCHEIDT, G. N. Potential of isolated antagonism of *Trichoderma* against isolated from *Fusarium* sp., in vitro. **Revista Verde** v. 10, n.1, p. 236 - 242, jan-mar, 2015

**IBGE**. Base de dados. Disponível em:< [http://downloads.ibge.gov.br/downloads\\_estatisticas.htm](http://downloads.ibge.gov.br/downloads_estatisticas.htm)>. Acesso: 05 mai. 2017.

JACKSON, M.; KARWOSWKI, J. P.; HUMPHREY, P. E.; KOHL, W. L.; BARLOW, G. J.; TANAKA, S. K. Calbistrins, novel antifungal agentes produced by *Penicillium restrictum*. *The Journal of Antibiotics*, Tokyo, v.46, p.34-38, 1993.

KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 91, p. 81-87, 2013.

LUNARDELLI, P. N. C et al. Importance and implications of the production of phenolic secondary metabolites by endophytic fungi: a minireview. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 4, p. 259-271, 2016.

MATIELLO, J et al. Síntese de Fitoalexinas em Soja e Sorgo por Extratos e Tinturas Pertencentes a Três Espécies Florestais. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 617-633, 2016.

MAZARO, Sergio Miguel et al. Induction of phytoalexins in cotyledons of soybean in response to the derivatives of leaf surinan cherry. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1824-1829, 2008.

MELO, W.R.F., LIMA, M.L.P. Aspectos gerais e morfológicos do fungo *Fusarium* sp. estudo em doenças de plantas - **IFGoiano câmpus** Urutaí, outubro de 2010.

MIRANDA, C. A.; S. F et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Integração de métodos biocompatíveis no manejo de doenças e pragas: experiências em plantas ornamentais e medicinais. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Congresso brasileiro de fitopatologia, 41., 2008, Belo Horizonte. *Tropical Plant Pathology*, v. 33, supl., p. S31-S34, 2008.

OLIVEIRA, M. M.; ASSIS, F. G. Val.; LEAL, P. L. Eficiência de fungos filamentosos no controle biológico da vassoura de bruxa do cacauzeiro. *Sítientibus série Ciências Biológicas* 23 dez. 2014

PAMPFILE, J. A et al. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *colletotrichum* sp. **Revista uningá**, v. 53, n. 1, 2017.

PAULUS, D. et al. Biomassa e composição do óleo essencial de manjerição cultivado sob malhas fotoconversoras e colhido em diferentes épocas. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 46-53, 2016.

PEREIRA, A. J et al. Inibição in vitro do crescimento micelial de *colletotrichum* spp. Por óleos essenciais *in vitro* inhibition of mycelial growth of *Colletotrichum* spp. by essential oils. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 11, p. 113-120, 2013.

PINHEIRO, L. F et al. Fibra de bananeira (*Musa* sp.): Produção e potencial de aplicações no brasil. **6º Contexmod**, v. 1, n. 6, 2018.

RAMPAZZO, E.F. Aspectos gerais da cultura da banana: Produção, Aspectos morfológicos, Planejamento dos pomares. **Instituto EMATER**. Governo do Estado do Paraná. 2014

RUFINO, C. P. B., ARAÚJO, C. S., NOGUEIRA, S. R. Challenges in the use of biological control of plant diseases in the amazon. **Journal of basic education, technical and technological**. v.5, n.1, 2018

SÁ, M. N. F.; LIMA, J. S.; JESUS, F.N.; PEREZ, J.O.; GAVA, C.A.T. Seleção in vitro de agentes de biocontrole visando o controle de *Fusarium* sp. **Acta Brasiliensis**, vol. 1, p.14-16, 2019

SANTOS, A.P et al. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 14 April 2010

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, dez. 2011

SANTOS, U.; RAMOS, C.O.; SANCHES, N.M.; FURTADO, F.S. Antibacterial Property Of Fruit Sucupira-White (*P. pubescens*). **Revista Eletrônica de Biologia**, v.3, n° 4, 2010

SARAIWA, R. M et al. Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrole. **Revista de Ciências Agrícolas**, v. 31, n. 1, p. 78-91, 2014.

SILVA, D. T et al. Análise do efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial das folhas de *Nectandra grandiflora* Nees. **Revista Árvore**, v. 39, n. 6, 2015.

STANGARLIN, J. R et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 11, n. 3, p. 16-21, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I.M.; MURPHY, A. Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal. 6. ed. **Artmed**, Porto Alegre. 2017.

TALAPATRA, K. et al. *In vitro* antagonistic activity of a root endophytic fungus towards plant pathogenic fungi. **Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol**, v. 5, n. 02, p. 068-071, 2017.

TORRES, F. L.; LACAVALA, P. T.; SOUZA, C. P. Isolamento, caracterização e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados à plantas do cerrado. **Universidade federal de São Carlos-UFSCar**. P.11-23. São Paulo, março de 2018.

VALADARES, R. B. S et al. Isolamento e Identificação de Fungos Micorrízicos de *Gomezia* SP (Orchidaceae) em uma floresta de Araucária do Estado de São Paulo. 2008.

WALKER, C et al. Morphological, molecular and pathogenicity characterization of *Fusarium acuminatum* and *Fusarium verticillioides* to *Cordia americana* seeds. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, p. 463-473, 2016.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 138-143, 1998.

YAMAOKA, N.; LYONS, P.C.; HIPSKIND, J.; NICHOLSON, R.L. Elicitor of sorghum phytoalexin synthesis from *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.37, p.255-270, 1990.