



**Lívia Pimenta**

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS  
PRODUZIDOS POR FUNGOS ASSOCIADOS À  
MADEIRAS EM DECOMPOSIÇÃO E  
TÓXICOS A PATÓGENOS DE  
IMPORTÂNCIA FLORESTAL E  
AGRONÔMICA**

**LAVRAS – MG  
2013**

LÍVIA PIMENTA

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR  
FUNGOS ASSOCIADOS À MADEIRAS EM DECOMPOSIÇÃO E  
TÓXICOS A PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA FLORESTAL E  
AGRONÔMICA**

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**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Pimenta, Lívia.

Compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos associados a madeira em decomposição e tóxicos a patógenos de importância florestal e agrônômica / Lívia Pimenta. – Lavras : UFLA, 2013.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Maria Alves Ferreira.

Bibliografia.

1. *Cylindrocladium candelabrum*. 2. *Xanthomonas axonopodis*.  
3. Nematoides das galhas. 4. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.2

Lívia Pimenta

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR  
FUNGOS ASSOCIADOS À MADEIRAS EM DECOMPOSIÇÃO E  
TÓXICOS A PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA FLORESTAL E  
AGRONÔMICA**

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 2013

Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro

UNIMONTES

Dr. Vicente Paulo Campos

UFLA

Dra. Maria Alves Ferreira

Orientadora

**Lavras - MG**

**2013**

*A Deus,*

*AGRADEÇO*

*A memória do meu querido pai;*

*A minha Mãe ;*

*Aos meus irmãos e ao Glauco;*

*Pelo apoio e incentivo*

*DEDICO*

## **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,s pela orientação e permissão para uso do laboratório de nematologia;

As minhas queridas colegas de laboratório; Amanda, Renata e Abigail, pela amizade e ajuda na condução do experimento;

Aos amigos do laboratório de nematologia, Aline, Julio, Luma, Felipe, Thaisa, Liliana, Arinaldo, Eduardo, Lilian, Willian, Samantha, Cleber e Tarley, pelo companheirismo e também ajuda nos experimentos;

Ao meu namorado, Glauco, pela força, paciência e compreensão;

Aos amigos do DFP/UFLA, Steffany Araújo, Marina Rondon, Ana Karla e a toda equipe do Núcleo de estudo – NEFIT, pelo apoio e amizade.

## RESUMO

Pesquisas envolvendo os efeitos tóxicos da emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs) por microrganismos contra fitopatógenos têm sido intensificadas nos últimos anos. O estudo de COVs pode contribuir para a elaboração de substâncias com alto potencial para o controle de fitopatógenos. Assim, o objetivo da autora com este trabalho foi selecionar isolados de fungos associados à madeira produtores de COVs tóxicos à *Meloidogyne incognita*, *Xanthomonas axonopodis* e *Cylindrocladium candelabrum*. Todos os isolados testados emitiram COVs que causaram imobilidade aos juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) que variou de 100 a 80%. A mortalidade de J<sub>2</sub> causadas pelos COVs de 16 isolados foi maior que na testemunha e variou de 32 a 12%. Quando os J<sub>2</sub> foram expostos por tempos diferentes aos COVs de nove desses isolados, a imobilização de 50% deles demandam de 5 a 16 horas de exposição variando entre isolados. O número de galhas resultante da inoculação de J<sub>2</sub> previamente expostos com COVs dos isolados fúngicos PD8 e PD29 em mudas de tomateiro não diferiram da testemunha, porém o número de ovos foi significativamente reduzido. Os COVs desses fungos também reduziram o número de unidades formadoras de colônias (u.f.c.) quando as culturas de *X. axonopodis* foram expostas a eles. Três grupos de isolados diferiram, significativamente, da testemunha, sendo que os isolados do primeiro grupo apresentaram de 75 a 59%, os isolados do segundo grupo 53 a 42% e os isolados do terceiro grupo de 35 a 18% de redução no número de u.f.c. Os COVs de todos os isolados fúngicos associados à madeira reduziram significativamente a germinação de conídios de *C. candelabrum*. COVs de 15 isolados reduziram a germinação de conídios em 88,6 a 72,8%, enquanto que a germinação dos conídios de 13 isolados variou de 70 a 50% em relação à testemunha. Quando os conídios foram expostos aos COVs de nove isolados fúngicos ocorreu redução na infecção em plantas de eucalipto. A toxicidade de COVs fúngicos a *M. incognita*, *X. axonopodis* e *C. candelabrum* demonstra outra forma eficiente de antagonismo entre eles.

Palavras chaves: Controle biológico, *Meloidogyne incognita*, *Xanthomonas axonopodis*, *Cylindrocladium candelabrum*.

## ABSTRACT

Researches involving the toxic effect of the emission of volatile organic compound (VOCs) by microorganisms against phytopathogens have been intensified in the last years. The study of VOCs may contribute to the elaboration of high potential phytopathogens control substances. Thus, the objective of this work was to select isolates of fungi associated with VOCs producing woods, toxic to *Meloidogyne incognita*, *Xanthomonas axonopodis* and *Cylindrocladium candelabrum*. All the tested isolates emitted VOCs, which caused immobility to the second stage juveniles (J<sub>2</sub>) which varied from 100 to 80%. The J<sub>2</sub> mortality caused by the VOCs of 16 isolated was greater than the witness and varied from 32 to 12%. When the J<sub>2</sub> were exposed for different time periods to the VOCs of nine of these isolates, the immobilization of 50% demanded the exposure from 5 to 16 hours, varying between isolates. The number of galls resulting of J<sub>2</sub> inoculation, previously exposed to the VOCs of the PD8 and PD29 fungi isolates in tomato seedlings, did not differ from the witness. However, the number of eggs was significantly reduced. The VOCs of these fungi also reduced the number of colony forming units (u.f.c) when cultures of *X. axonopodis* were exposed. Three isolate groups differed significantly from the witness, with the isolates from the first group presenting 75 to 59%, the isolates from the second group, 53 to 42% and the isolates from the third group, 35 to 18% of reduction in the number of CFU. The VOCs of all fungi isolates associated to wood significantly reduced *C. candelabrum* conidia germination. VOs of 15 isolates reduced conidia germination in 88.6 to 72.8%, while conidia germination of 13 isolates varied from 70 to 50% in relation to the witness. When the conidia were exposed to the VOCs of nine fungi isolates, occurred the reduction of infection in eucalyptus plants. The toxicity of fungi VOCs to *M. incognita*, *X. axonopodis* and *C. candelabrum* shows another efficient form of antagonism between them.

Keywords: Biological control, *Meloidogyne incognita*, *Xanthomonas axonopodis*, *Cylindrocladium candelabrum*.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Fungos associados à madeiras</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4 Compostos orgânicos voláteis no controle de nematoides</b> .....	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>27</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>27</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>28</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1. Isolamento, preparo e manutenção dos isolados de fungos associados à madeira</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i></b> .....	<b>31</b>
<b>2.3 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos associados à madeira a juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>.</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis a juvenis de segundo estágio (<math>J_2</math>) de <i>Meloidogyne incognita</i> em diferentes períodos de exposição.</b> .....	<b>34</b>
<b>2.5 Infectividade e reprodução de juvenis de segundo estágio (<math>J_2</math>) de <i>Meloidogyne incognita</i> após exposição aos compostos orgânicos voláteis fúngicos.</b> .....	<b>34</b>
<b>2.6 Estatística e análise dos dados</b> .....	<b>35</b>
<b>2.7 Caracterização molecular dos isolados fúngicos</b> .....	<b>35</b>
<b>2.7.1 Extração de DNA</b> .....	<b>35</b>
<b>2.7.2 Amplificação e purificação</b> .....	<b>36</b>
<b>2.8 Análises dos fragmentos da região ITS</b> .....	<b>37</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos associados à madeira a juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i>.</b> .....	<b>38</b>

<b>3.2 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis a juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de <i>Meloidogyne incognita</i> em diferentes períodos de exposição.</b> .....	<b>40</b>
<b>3.3 Infectividade e reprodução de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de <i>Meloidogyne incognita</i> após exposição aos compostos orgânicos voláteis fúngicos.</b> .....	<b>40</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>5.0 CONCLUSÕES</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>51</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>51</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>52</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>2. Material e métodos</b> .....	<b>55</b>
<b>2.1. Preparo e manutenção dos isolados de fungos associados à madeira.</b> .....	<b>55</b>
<b>2.2. Atividade de compostos orgânicos voláteis na toxicidade à <i>Xanthomonas axonopodis</i>.</b> .....	<b>55</b>
<b>2.3. Atividade de COVs sobre a germinação de conídios de <i>Cylindrocladium candelabrum</i>.</b> .....	<b>56</b>
<b>2.4. Efeito dos COVs na infecção de conídios de <i>Cylindrocladium candelabrum</i> em mudas de eucalipto.</b> .....	<b>58</b>
<b>2.5 Delineamento estatístico e análise dos dados</b> .....	<b>58</b>
<b>2.6 Caracterização molecular dos isolados fúngicos.</b> .....	<b>59</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
<b>3.1 Atividade de compostos orgânicos voláteis na toxicidade à <i>Xanthomonas axonopodis</i>.</b> .....	<b>60</b>
<b>3.2 Atividade de COVs sobre a germinação de conídios de <i>Cylindrocladium candelabrum</i>.</b> .....	<b>61</b>
<b>3.3 Efeito dos COVs na infecção de conídios de <i>Cylindrocladium candelabrum</i> em mudas de eucalipto.</b> .....	<b>62</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos tem intensificado a busca por novos métodos que substituam defensivos tóxicos, principalmente na área agrônômica e, atualmente também na área florestal. Métodos alternativos para controle de patógenos tem sido estudados com o intuito de reduzir o uso desses defensivos. Comparado as formas de controle de fitopatógenos tradicionais, o controle biológico vem sendo intensamente estudado, principalmente por não causar grandes danos ambientais (GU et al., 2007).

Fungos associados à madeira, principalmente fungos de podridão, podem ser promissores no controle biológico, uma vez que ao liberarem enzimas degradantes que reagem com o substrato, ou seja, as celuloses, hemiceluloses e lignina, produzem diferentes metabólitos. Alguns desses fungos produzem ou induzem metabólitos primários e secundários que melhoraram o desempenho do seu hospedeiro, protegendo-o de herbívoros, patógenos e diversas situações ambientais (CLAY; SHARDL, 2002).

Entre esses metabólitos destacam-se os compostos orgânicos voláteis (COVs). Os COVs são substâncias que podem transpor as membranas com facilidade e serem liberadas no ar ou no solo na ausência de uma barreira de difusão (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). Metabólitos voláteis possuem algumas vantagens sobre compostos não voláteis, pois podem agir em locais distantes dos sítios de produção.

Os efeitos inibitórios de COVs de origem fúngica contra outros microrganismos são de interesse na aplicabilidade como controle biológico, pois a exposição aos COVs pode inibir a germinação de esporos em um grande número de espécies fúngicas (ROBINSON; McKEE; THOMPSON,

1989) e serem tóxicos a outros microrganismos como nematoides (STROBEL et al., 2001; JACOBSEN et al., 2004; RIGA et al., 2008; FREIRE et al., 2012).

O estudo da influência de COVs, produzidos por fungos associados à madeira, pode levar a descoberta de compostos antagônicos para diversos patógenos que atacam espécies de importância florestal e também para patógenos de importância agrônômica como os nematoides. Desta forma, o objetivo com este trabalho foi selecionar fungos associados à madeira produtores de COVs com efeito tóxico à *Meloidogyne incognita*, *Cylindrocladium candelabrum* e *Xanthomonas axonopodis*, identificar as espécies selecionadas, verificar a infectividade de juvenis de segundo estágio de *M.incognita* e infectividade de *C. candelabrum* em eucalipto após exposição aos COVs dos fungos selecionados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fungos associados à madeiras

A madeira ocupa uma posição de destaque em relação à outros materiais, pois apresenta uma ampla gama de aplicações. Suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, são responsáveis pela inclusão deste material em projetos arquitetônicos e de engenharia, bem como na industrialização de moveis, instrumentos e vários outros tipos de produtos. Em função da sua complexidade anatômica e química pode sustentar uma rica comunidade de microrganismos (DIX; WEBSTER, 1995).

Fungos embololadores e manchadores de madeira são os primeiros a colonizarem a madeira devido à quantidade de substâncias de reserva, das quais eles se nutrem além da elevada umidade (HANADA et al., 2003). A madeira também é colonizada por fungos degradadores, mais conhecidos como fungos de podridão branca, marrom ou mole que liberam enzimas, as quais reagem com os constituintes da parede celular a nível molecular, causando a quebra desta estrutura (GIMENES, 2010).

A biodiversidade de fungos associados à madeiras é composta por representantes dos filos como Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota (HUANG et al., 2001; SURYNARAYANAN et al., 2005), principalmente por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Neotyphodium*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Neotyphodium* (ALMEIDA et al., 2005), *Schizophyllum*, *Armillaria*, *Heterobasidion*, *Trametes*, *Pyconoporus*, *Fomes*, *Phellinus*, *Piptoporus*, (SCHMIDT, 2006) *Lasiodiplodia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* (HANADA et al., 2003) *Mucor*, *Phlebiopsis*, *Coprinus*, *Eutypella*, *Phanerochaete*, *Phoma* (VIEIRA, 2008), entre outros.

A presença de tais microrganismos, provavelmente, ocorre em consequência do estresse da planta, pelo empobrecimento nutricional e

alteração do pH do substrato, o que gera uma redução na resistência da planta (ALMEIDA et al., 2005).

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; SHARDL, 2002).

Atualmente, fungos endofíticos e degradadores de madeira (e/ou seus sistemas degradativos) têm sido estudados em razão do elevado potencial de utilização no controle de microrganismos além do uso para biodegradação de compostos xenobióticos, biorremediação de solos, biopolpação da madeira e biobranqueamento de polpas celulósicas (ANDERSSON; HENRYSSON, 1996; POINTING, 2001).

## **2.2 Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)**

Sabe-se que organismos imóveis, tais como plantas e fungos são incapazes de escapar do ataque de herbívoros ou microrganismos, o que levou à evolução de uma série de estratégias de defesa para evitar o desenvolvimento de tais inimigos.

Atualmente, existem inúmeros estudos sobre a ecologia química de uma variedade de plantas, incluindo a suas estratégias de defesa. Os estudos envolvendo fungos, se concentram na investigação de metabólitos secundários com o intuito de isolar compostos bioativos para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de patógenos (HARBONE, 1999). Alguns desses compostos já são utilizados no mercado como antibióticos e antifúngicos. *Strobilurus tenacellus*, por exemplo, produz as estrobilurinas, uma classe de compostos antifúngicos que levou a produção de fungicidas comercialmente disponíveis (SAUTER et al., 1999). O papel ecológico das estrobilurinas demonstraram que *S. tenacellus* é capaz

de evitar o crescimento de outros microrganismos no meio onde o fungo cresce.

Pesquisas sobre a produção de COVs produzidos por plantas, bactérias e fungos vêm sendo intensificadas, pois vários trabalhos tem mostrado alto potencial para o controle de fitopatógenos (KESSELMEIER; STAUDT, 1999; LEFT; FIERER, 2008; RIGA et al. 2008; FREIRE et al., 2012).

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; DUDAREVA, 2006). Além disso, podem ser espalhados rapidamente pelo movimento de solução aquosa e pelo fluxo em massa de água pelo perfil do solo (WHEATLEY ET al., 2002).

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 (DUDAREVA et al., 2006).

Vários são os relatos dos compostos orgânicos voláteis 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 a resistência (ARIMURA et al., 2001; AHARONI et al., 2003; KESSLER et al., 2006).

A maioria das pesquisas que examina os COVs provenientes de ecossistemas terrestres se concentram na produção de tais substâncias pelas plantas (KESSELMEIER; STAUDT, 1999; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010) que, de acordo com Knudsen e Gershenzon (2006) podem produzir mais de 1700 COVs.

O conhecimento sobre compostos voláteis foi expandido graças a métodos simples e sensíveis avaliados por cromatografia gasosa. A maioria destas substâncias relatadas está distribuída nas seguintes classes: terpenóides, ácidos graxos, benzenóides, fenilpropanóides e vários compostos contendo enxofre (STEEGHS et al., 2004).

Alguns estudos mostram o efeito positivo de pulverizações de substâncias que agem como indutores em plantas. Como exemplo, *Catharanthus roseus* (vinca-de-madagáscar) e *Cinchona ledgeriana* foram pulverizadas com jasmonato de metila na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e tal substância duplicou a produção de alcalóides (AERTS et al., 1994) na planta. Na conífera *Picea abies* a aplicação de jasmonato de metila induziu a formação de uma oleoresina rica em terpenóides que protege as plantas de pragas e doenças (MARTIN et al., 2002).

Arimura et al. (2001) verificaram que *Phaseolus lunatus*, quando atacada por ácaros herbívoros liberam voláteis como o (Z)-hex-3-en-1-ol, (E)-hex-2-enal e acetato de (Z)-hex-3-enila que ativam proteínas relacionadas ao sistema de defesa em planta vizinhas não atacadas pelo inseto. Além disso, (E)-hex-2-enal é tido como um ativador de genes de defesa da planta induzindo o aumento da lignificação como ocorre em plantas de *Arabidopsis thaliana* quando atacada pelo fungo *Botrytis cinerea*. A planta também resiste ao fungo na presença de (Z)-hex-3-enal, (Z)-hex-3-en-1-enol ou allo-ocimeno (KISHIMOTO et al., 2005).

O mecanismo de ação de muitos compostos orgânicos voláteis ainda não foi elucidado o que torna necessário efetuar estudos que averiguem o efeito dessas substâncias e suas concentrações no controle de fitopatógenos.

### 2.3 Compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos

Fungos que são associados madeira podem produzir substâncias voláteis. Entretanto existem poucos estudos direcionados a essa produção, bem como seu uso para o controle de doenças. Os estudos existentes relacionados à atividade antimicrobiana de COVs sobre microrganismos fitopatogênicos estão voltados para ascomicetos como os fungos *Muscodor albus* e *Trichoderma* spp. (FIALHO, 2008).

*Muscodor albus* é um fungo endofítico, relatado como um potente agente de controle de bactérias e fungos em virtude dos compostos voláteis que o mesmo produz (STROBEL et al., 2001). Mercier e Jemeniz (2004) relataram que diversas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* foram inibidas por voláteis produzidos por *M. albus*.

Bastos (1991) verificou a produção de antibióticos por espécies de *Trichoderma* e sua possibilidade de volatilização. Dentre os antibióticos produzidos incluem-se gliotoxina, viridina e trichodermina, os quais inibem o crescimento de outros fungos. Eziashi et al. (2006) também verificaram que espécies de *Trichoderma* produzem substâncias que afetam o crescimento micelial, em ensaios *in vitro*, contra *Ceratocystis paradoxa*.

Recentemente outras espécies de fungos são relatadas como produtoras de COVs tóxicos. Melo et al. (2012) por exemplo, observaram que *Xanthomonas vesicatoria* submetida a compostos voláteis produzidos por fungos saprófitas teve o seu crescimento inibido. Os COVs dos fungos *Dictyochaeta simplex*, *Gonytrichum chlamydosporium*, *Stachybotrys globosa*, *Curvularia inaequalis* e *Volutella minima* apresentaram inibições do crescimento bacteriano de 53,9, 54,7, 59,5, 60,9 e 77,6% respectivamente.

Diferentes doses dos compostos voláteis 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, identificados dentre as substâncias liberadas pela a linhagem CR-1 de *Saccharomyces cerevisiae* com atividade antifúngica foram avaliadas

sendo consideradas tóxicas a *X. vesicatoria*. As mais altas (25 e 50 µL), controlaram 100% o crescimento de *X. vesicatoria* (BALBI-PEÑA et al., 2012).

Ewen et al. (2004) utilizando diferentes técnicas para identificação de compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos apodrecedores de madeira, observaram que *Serpula lacrymans* produzia abundantemente o composto 1-octen-3-ol que é um álcool alifático encontrado em cogumelos e plantas. O fungo *Coniophora puteana* que também foi avaliado neste estudo produziu: dietileno, 2,3-dihidro-3, 5-diidroxí-6-metil-(4H)-pirano-4-ona, 2-etil-2,4-dimetil, 4-metil metilbenzoato, 2-metilpentanoico. O efeito de tais moléculas contra microrganismos não foram testados pelos autores, entretanto, tais compostos já foram estudados por vários outros pesquisadores que verificaram sua influência no controle de fitopatógenos (ROSECKE; KONIG, 2000; CHITARRA et al., 2004).

Avaliando mudanças na produção de voláteis durante o curso de encontro de micélio de *Hypholoma fasciculare* e *Resinicium bicolor*, dois fungos colonizadores de madeira, Hynes et al. (2007) constatou a produção de sesquiterpenos como parte normal do metabolismo de cada fungo. Além dos sesquiterpenos, um éster metílico de ácido benzoico, álcool benzílico e um composto tipo quinolinio foram detectados. De acordo com Boddy (2000) o encontro de micélios de *H. fasciculare* e *R. bicolor* produz uma resposta antagônica quando não são compatíveis, acompanhada de alteração na morfologia da zona de interação, produção de enzimas extracelulares e substâncias que podem evitar o crescimento de ambos fungos.

Fialho et al. (2010) demonstraram que compostos voláteis constituídos por alcoóis são os principais responsáveis pela bioatividade de *S. cerevisiae* contra o fungo *Guignardia citricarpa*. Esses voláteis atuaram reduzindo a síntese de proteínas e a atividade enzimática do patógeno. Os voláteis 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, em alta concentração são capazes de suprimir de forma completa o desenvolvimento de *G. citricarpa*.

Sesquiterpenos foram verificados por Roy et al. (2003) quando trabalharam em campo com o fungo *Phaeotheca dimorphospora* em pinheiro (*Pinus resinosa*) controlando *Heterobasidion annosum*. Neste caso o antagonista produziu sesquiterpenos e outros metabólitos antifúngicos ao colonizar a madeira, impedindo, assim, o desenvolvimento de *H. annosum*.

Segundo Abraham (2001), sesquiterpenos produzidos por fungos apresentam uma importante propriedade biológica antifúngica e antibacteriana, sendo considerados assim como potenciais agentes de controle biológico na preservação da madeira (GRAMSS; BERGMANN, 2008).

Rosecke e König (2000) avaliando produtos hidrodestilados de fungos associados à madeira (*Fomitopsis pinicola*, *Piptoporus betulinus*, *Gloeophyllum odoratum* e *Trametes suaveolens*) identificaram a presença de inúmeros mono e sesquiterpenos, além de muitos alcóois alifáticos, aldeídos, cetonas e compostos aromáticos. Neste estudo o trans-nerolidol e o linalool foram encontrados em *P. betulinus* e *G. odoratum* que são tidos como importantes metabólitos constituintes de fungos.

#### **2.4 Compostos orgânicos voláteis no controle de nematoides**

Os estudos relatados anteriormente com efeitos positivos da produção de COVs na redução de patógenos fúngicos e bacterianos levam também ao interesse em pesquisas para o uso dos mesmos no tratamento de substrato para eliminação de nematoides. Apesar de não ser um patógeno de grande importância florestal, o grande número de hospedeiros existentes, coloca os nematoides entre os principais patógenos responsáveis pela limitação da produtividade agrícola (SASSER; FRECKMAN, 1987; SASSER; CARTER, 1985).

Na ausência de cultivares resistentes e na impossibilidade de realizar rotação de culturas, os nematicidas sintéticos são utilizados para reduzir

populações de fitonematoides. O controle químico de nematoides geralmente é pouco efetivo, apresenta custos elevados e pode deixar resíduos nos alimentos, prejudicando a saúde humana e o ambiente (CAMPOS, 1997).

Os COVs vem sendo relacionados como um mecanismo de defesa de plantas contra organismos fitopatogênicos. Vários estudos comprovam a eficiência de diversas substâncias voláteis produzidas por plantas, fungos bactérias e outros no controle de fitonematoides (RIGA et al., 2008; FREIRE et al., 2012; FIALHO et al., 2012). Freire et al. (2012), por exemplo, mostraram o efeitos dos COVs produzidos por *Fusarium oxysporum* no controle do nematoide. Os isolados mais eficazes, avaliados no experimento, causaram tanto imobilidade quanto mortalidade à J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Um dos isolados testados causou imobilidade porém não causou a mortalidade. Além disso os autores constataram que a exposição aos COVs produzidos por *F. oxysporum* diminuiu a infectividade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* em comparação com a testemunha.

O efeito nematicida de COVs fumigados em vermiculita contendo *M. javanica* foi avaliado por Fialho et al. (2012) que constataram um alto potencial nematicida da mistura sintética de COVs, chegando a uma mortalidade dos nematoides superior a 30% na menor dosagem testada (33,3 µL g<sup>-1</sup> de substrato), enquanto que as maiores doses (100 e 200µL) proporcionaram 100% de mortalidade. Em outro trabalho, Grimme et al. (2007) verificaram que a fumigação do solo infestado com *M. incognita*, por meio de voláteis produzidos por *M. albus* causou 74 e 100% de mortalidade dos nematoides após 72 e 168 horas de tratamento respectivamente.

Riga et al. (2008) utilizando uma formulação de *M. Albus*, verificaram que populações *M. chitwood* e *M. hapla* foram reduzidas entre 85% e 100% nas raízes e, no solo, a redução variou entre 56% e 100%, demonstrando assim que *M. albus* possui propriedades nematostática e nematicida.

A busca por moléculas voláteis produzidas por fungos associados à madeira abre a possibilidade de se encontrarem, no mercado, análogos

comerciais com potencial para serem empregados como controle de patógenos de importância florestal e agronômica.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, W. R. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 8, n. 6, p. 583-606, May 2001.

AERTS, R. B. et al. Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. **Plant Journal**, Malden, v. 5, n. 5, p. 635-643, May 1994.

AGGER, S.; LOPEZ-GALLEGO, F.; SCHMIDT-DANNERT, C. Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 72, n. 5, p. 1181-1195, June 2009.

AHARONI, A. et al. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 12, p. 2866-2884, Dec. 2003.

ALMEIDA, C. V. et al. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 467-470, maio 2005.

ANDERSSON, B. E.; HENRYSSON, T. Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Appl. Microbiology Biotechnology*, Seoul, v. 46, p. 647-652, Dec.1996.

ANDJIC, V. et. al. Plants for planting; indirect evidence for the movement of a serious forest pathogen, *Teratosphaeria destructans*, in Asia. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 131, p. 49-58, Sept. 2011.

ANKER, T.; THINES, E. Br. Fungal metabolites as lead structures for agriculture. **British Mycological Society Symposia**, London, v. 26, p. 45-58, May 2007.

ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 151-158, mar. 2006.

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

- BALBI-PEÑA, M. I. et al. Efeito de 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol no crescimento in vitro de *Xanthomonas vesicatoria*. **Tropical Plant Pathology**, Manaus, v. 38, p. 426, ago. 2012. Suplemento.
- BASTOS, C. N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.
- BODDY, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. **Fems Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 31, p.185-194, Mar. 2000.
- CAMPOS, V. P. Controle de doenças: doenças causadas por nematoides. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. v. 1, p. 141-179.
- CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 525-535, 2010.
- CHITARRA, G. S. et. al. Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-Octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, n. 5, p. 2823-2829, May 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. 549 p.
- DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 25, n. 5, p. 417-440, Sept. 2006.
- EWEN, R. J. et al. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of the volatile organic compounds emitted from the wood-rotting fungi *Serpula lacrymans* and *Coniophora puteana*, and from *Pinus sylvestris* timber. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 7, p. 806-814, July 2004.
- EZIASHI, E. I. et al. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 6, p. 703-706, Apr. 2006.

FAULSTICH, D. S. et al. Architecture of coatomer: molecular characterization of delta-COP and protein interactions within the complex. **Jornal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 135, n. 1, p. 53-61, Oct. 1996.

FIALHO, M. B. **Mecanismos de ação de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citrus**. 2008. 120 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FIALHO, M. B. et al. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 2, p.152-154, jun. 2012.

FIALHO, M. B. et al. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 925-932, May 2010.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, Hanover, 2012. In press.

GIMENES, L. J. **Fungos basidiomicetos: técnicas de coleta, isolamento e subsídio para processos biotecnológicos**. São Paulo: Instituto de Botânica; Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, 2010.

GRAMSS, G.; BERGMANN, H. Role of plants in the vegetative and reproductive growth of saprobic basidiomycetous ground fungi. **Microbial Ecology**, Oslo, v. 56, n. 4, p. 660-670, May 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**, Quebec, v. 91, n. 2, p. 220-225, Feb. 2007.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.

HANADA, R. E. et al. Fungos emboloradores e manchadores de madeiras no município de Manaus, Amazonas, Brazil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 3, p. 483-488, Apr. 2003.

HARBORNE, J. B. Plant chemical ecology in comprehensive natural products chemistry. **Elsevier**, Jena, v. 8, n. 3, p. 137-196, May 1999.

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.

HYNES, J. et al. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 1, p. 43-57, Mar. 2007.

JACOBSEN, B. J. et al. Mycofumigation with *Muscodor albus* for control of soil-borne microorganisms. **Multitrophic Interactions in Soil**, Bull, v. 27, n. 1, p. 12-25, June 2004.

KESSELMEIER, J.; STAUDT, M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. **Journal of Atmospheric Chemistry**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 23-88, May 1999.

KESSLER, A. et al. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. **Oecologia**, Berlin, v. 148, n. 7, p. 280-292, Apr. 2006.

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. 3, p. 1093-1102, Apr. 2005.

KNUDSEN, J. T.; GERSHENZON, J. The chemistry diversity of floral scent. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Ed.). **Biology of floral scent**. London: Taylor & Francis, 2006. p. 27-52.

KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 619-628, Jan. 2006.

LEFF, J. W.; FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology & Biochemistry**, Berlin, v. 40, n. 2, p. 1629-1636, Mar. 2008.

MARTIN, D. et al. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of norway spruce stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 7, p. 1003-1018, July 2002.

- 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.
- MERCIER, J.; JIMENEZ, J. I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology**, Berlin, v. 31, p. 1-8, Nov. 2004.
- PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, New York, v. 311, n. 5762, p. 808-811, Feb. 2006.
- POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 57, n. 2, p. 20-33, Oct. 2001.
- RIGA, E. et al. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, San Diego, v. 45, n. 3, p. 380-385, June 2008.
- ROBINSON, P. M.; McKEE, N. D.; THOMPSON, L. A. A. Autoinhibition of germination and growth in *Geotrichum candidum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 93, n. 2, p. 214-222, Sept. 1989.
- ROSECKE, J.; KONIG, W. A. Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. **Phytochemistry**, New York, v. 54, n. 6, p. 603-610, July 2000.
- ROY, G. et al. Field tests on biological control of *Heterobasidion annosum* by *Phaeothecha dimorphospora* in comparison with *Phlebiopsis gigantea*. **Forest Pathology**, Berlin, v. 33, n. 2, p. 127-140, Apr. 2003.
- SASSER, J. N.; CARTER, C. C. Overview of the international *Meloidogyne* project (1975-1984). In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne: biology and control**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. v. 1, p. 19-24.
- SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on Nematology**. Maryland: Society of Nematologists, 1987. p. 7-14.
- SAUTER, H. et al. Strobilurins: evolution of a new class of active substances. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 38, n. 10, p. 1328-1349, May 1999.

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

STEEGHS, M. H. P. et al. Proton-transfer-reaction mass spectrometry as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds in arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 135, n. 1, p. 47-58, May 2004.

STROBEL, G. A. et al. **Compositions related to a novel endophytic fungi and methods of use.** United States, 20040141955. Jul. 2004

STROBEL, G. A. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Washington, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products microbiol. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p. 491-502, Dec .2003.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 5, p. 635-639, May 2005.

VIEIRA, M. L. A. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Solanum cernuum* vell. (solanaceae).** 2008. 117 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

WHEATLEY, R. E. et al. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, Berlin, v. 81, n. 1/4, p. 357-364, Aug. 2002.

## CAPÍTULO 2

### FUNGOS ASSOCIADOS À MADEIRA PRODUZEM COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS TÓXICOS AO FITONEMATOIDE

*Meloidogyne incognita*.

#### RESUMO

A toxicidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de origem microbiana pode elucidar outro aspecto do antagonismo entre microrganismos, além de contribuir para a elaboração de substâncias nematicidas de baixa toxicidade e fácil manipulação. Neste trabalho realizado com técnica que permite apenas o contato pelo ar das moléculas ao nematoide *Meloidogyne incognita*, constatou-se, empregando-se a técnica desenvolvida com tubo SUPELCO®, que todos os 28 isolados fúngicos associados à madeira causaram redução significativa na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita* variando de 80 a 100% em comparação com o controle. Quando os J<sub>2</sub> foram expostos por tempos diferentes aos COVs de nove desses isolados fúngicos, a imobilização de 50% deles requereu 5 a 16 horas de exposição, variando entre isolados. Apenas 18 dos isolados que causaram imobilidade também causaram mortalidade significativamente diferente do controle, variando de 12 a 32%. Quando os J<sub>2</sub> foram expostos aos COVs de nove isolados fúngicos inoculados em tomateiros, a infectividade (número de galhas por grama de raiz) não foi afetada significativamente. Porém a reprodução (número de ovos por grama de raiz) de *M. incognita* foi reduzida significativamente comparada com o controle, pelos COVs dos isolados fúngicos PD8 e PD29 identificados como sendo das espécies *Epicoccum nigrum* e *Schizophyllum commune*. Os COVs produzidos pelos fungos associados à madeira apresentam efeito nematicida e nematostático à *M. incognita*.

Palavra chave: Compostos voláteis, *Meloidogyne incognita*, Controle biológico

## CHAPTER 2

### FUNGI ASSOCIATED WITH WOOD PRODUCE VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS TOXIC TO THE PHYTONEMATODE

*Meloidogyne incognita*.

#### ABSTRACT

The toxicity of Volatile Organic Compounds (VOCs) of microbial origin may elucidate other aspects of the antagonism between microorganisms, as well as contribute in the elaboration of low toxicity and easy handling nematicide substances. In this work, performed with a technique which allows the contact of molecules to the *Meloidogyne incognita* nematode only by air, we observed, applying the technique developed with the SUPELCO® tube, that all 28 fungal isolates associated to wood caused significant reduction of the mobility of second stage *M. incognita* juveniles (J<sub>2</sub>), varying from 80 to 100% compared to the control. When the J<sub>2</sub> were exposed for different time periods to the VOCs of nine of these fungal isolates, the immobilization of 50% of them required 5 to 16 hours of exposure, varying between isolates. Only 18 of the isolates which caused immobility also caused significant mortality, different from the control, varying from 12 to 32%. When the J<sub>2</sub> were exposed to the VOCs of nine fungal isolates inoculated in tomato plants, the infectivity (number of galls per gram of root) was not significantly affected. However, *M. incognita* reproduction (number of eggs per gram of root) was significantly reduced when compared with the control, by the PD8 and PD29 fungal isolates identified as being of the species *Epicoccum nigrum* and *Schizophyllum commune*. The VOCs produced by the fungi associated with wood presented nematicide and nematostatic effect on *M. incognita*.

Keywords: Volatile compounds, *Meloidogyne incognita*, Biological control.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fitonematoides causam grandes prejuízos as mais diversas culturas em todo o mundo (FERRAZ et al., 2010). Aqueles que parasitam raízes dificultam a absorção e a translocação de nutrientes, alterando assim a fisiologia da planta, predispondo o hospedeiro a doenças e a estresses ambientais (CHITWOOD, 2002). O grande número de hospedeiros existentes e a interação com outros organismos patogênicos colocam os nematoides entre os principais patógenos responsáveis pela limitação da produtividade agrícola (SASSER; CARTER, 1985; SASSER; FRECKMAN, 1987).

O método mais utilizado para o controle de nematoides tem sido o uso de nematicidas. Os primeiros nematicidas empregados na agricultura foram voláteis. Embora na década de 70 já existissem os organofosforados e organocarbamatos, os nematicidas voláteis dominaram o mercado o qual tinha o Nemagon como um dos produtos mais vendidos (WHITEHEAD, 1998). Entretanto, o Nemagon foi proibido nos Estados Unidos em 1978 e no Brasil em 1981. Desde então, o mercado de nematicidas foi dominado por produtos (organofosforados e organocarbamatos) que deixam resíduos nas plantas, e são, na maioria, de tarja vermelha, envolvendo alta periculosidade a saúde do homem e do meio ambiente, o que levou a proibição do uso, por exemplo, do Aldicarb na agricultura brasileira em 2011 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2013).

Fungos associados à madeira, principalmente fungos causadores de podridão, liberam enzimas que reagem com o substrato produzindo diferentes metabólitos. Alguns desses fungos produzem compostos que se destacam por melhorar o desempenho do seu hospedeiro, protegendo-o de herbívoros, patógenos e situações ambientais adversas (CLAY; SHARDL, 2002).

As pesquisas demonstram, ultimamente, a possibilidade do uso de plantas e microrganismos produtores de compostos orgânicos voláteis

(COVs) na esterilização de solos, substratos e no tratamento de plantas doentes por meio da biofumigação (LIMA, 2006; NEVES, et al., 2009; HUANG et al., 2010). Ainda é objetivo de pesquisas a diluição dos COVs em água tornando-a tóxica a outros organismos (WHEATLEY, 2002; RIGA, LACEY; GUERRA, 2008). Além da toxicidade a patógenos, os COVs podem servir para atrair inimigos naturais e ainda atuarem como sinalizadoras para ativação de genes relacionados à resistência (KESSLER et al., 2001; AHARONI et al., 2003; ARIMURA; KOST; BOLAND, 2005).

Assim, as investigações de COVs produzidos por fungos associados à madeira podem servir, futuramente, para a elaboração de produtos com potencial antimicrobiano de baixo custo, baixa toxicidade e de fácil manipulação (ARAB; BENT, 2006).

Dessa forma objetivou-se isolar fungos associados à madeira em decomposição, testar a toxicidade (imobilidade e mortalidade) de COVs produzidos por esses fungos aos J<sub>2</sub> de *M. incognita*, estudar os diferentes tempos de exposição aos J<sub>2</sub> de *M. incognita* aos COVs fúngicos, avaliar a infectividade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* expostos aos COVs fúngicos em mudas de tomateiro e caracterizar os isolados selecionados por meio da região ITS do DNA.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

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

Foram utilizados nos ensaios 28 isolados de fungos associados à madeira, coletados de diferentes substratos (árvores e tocos em decomposição) nos fragmentos florestais do campus da Universidade Federal de Lavras (TABELA 1). Para o isolamento dos fungos, fragmentos foram retirados dos corpos de frutificação e/ou de madeiras em decomposição e desinfestados superficialmente em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito 5% e eliminando o excesso de hipoclorito com água esterilizada. Após desinfestação superficial, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo Batata Dextrose Agar (BDA Himedia®) e incubados a 25 °C por sete dias. Posteriormente, os isolados foram armazenados por três processos diferentes, o primeiro foi em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, o segundo em glicerol 15% na temperatura de -80 °C e o terceiro pelo método de castellani em temperatura ambiente.

### **2.2 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita***

De populações puras de *M. incognita* multiplicadas em plantas de tomateiro e mantidas em casa de vegetação obteve-se uma suspensão de ovos de *M. incognita* empregando a técnica Hussey e Barker (1973) modificado por Boneti e Ferraz (1981). Para isso, raízes de tomateiro foram lavadas, cuidadosamente, em água corrente para retirada das partículas de solo aderidas, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaClO 0,5% por aproximadamente 20 segundos. A seguir a suspensão foi vertida em uma peneira de 0,074 mm de

abertura (200 “mesh”), acoplada a outra de 0,025 mm (500 “mesh”), ficando os ovos retidos nesta última. A contagem dos ovos foi realizada em câmara de Peters, e calibrada em microscópio de luz. Os ovos obtidos foram colocados em câmara de eclosão a 28 °C. Apenas os J<sub>2</sub> eclodidos, a partir de 48 horas da montagem da câmara, foram utilizados no experimento.

### **2.3 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos associados à madeira a juvenis de segundo estágio de *M. incognita*.**

Para seleção de isolados produtores de COVs tóxicos a *M. incognita* utilizou-se a técnica de Botelho (2010) que emprega frascos de 80x28 mm (39 mL de volume interno) SUPELCO<sup>®</sup> SPME com tampa rosqueada e revestida internamente por uma película de silicone, o qual permite total vedação. Nestes tubos foram adicionados 15 mL de agar-água e, sobre ele, 6mL do meio de cultura BDA. Um microtubo esterilizado de 1,5 mL foi introduzido no meio de cultura, até a altura mediana. Dois discos de 2 mm de diâmetro retirados das bordas das colônias dos fungos associados à madeira, com sete dias de crescimento, incubados a 25°C no escuro foram depositados sobre o meio BDA ao lado do microtubo em posições opostas e em seguida, vedou-se o frasco com Parafilm<sup>®</sup> (FIGURA 1). Como testemunha utilizou-se frascos sem a repicagem do fungo. Após seis dias de incubação com o auxílio de uma seringa, 1 mL de uma suspensão com 100 juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) foi depositado dentro do microtubo interno. Após a retirada da seringa, o orifício deixado foi vedado com fita adesiva e os frascos com os J<sub>2</sub> foram incubados em BOD a 25 °C por 24. Após esse período os tubos foram abertos e a suspensão de J<sub>2</sub> dos microtubos foi transferida para placa de polietileno onde se quantificaram os J<sub>2</sub> móveis e imóveis. Após 24 horas em água pura, quantificou-se o número de J<sub>2</sub> mortos.

Tabela 1. Isolados fúngicos de diferentes substratos coletados nas cidades de Lavras MG e Silveirânia, MG.

Código do isolado	Data de coleta	Cidade, Estado	Local
PD1	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD2	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD4	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD5	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD8	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD9	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD10	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD12	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD13	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD14	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD15	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD16	21/10/2011	Silveirânia, MG	Silveirânia, MG
PD17	21/10/2011	Silveirânia, MG	Silveirânia, MG
PD18	16/09/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD19	18/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD20	12/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD21	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD22	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD23	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD24	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD25	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD26	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD27	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD28	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD29	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD30	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD31	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD32	07/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA

#### **2.4 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis a juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* em diferentes períodos de exposição.**

Dentre os isolados fúngicos associados à madeira que emitiram COVs que causaram mais de 12% de mortalidade, nove deles (PD8, PD10, PD12, PD13, PD14, PD21, PD22, PD27 e PD29) foram selecionados para testar a sensibilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* pela exposição aos COVs em diferentes tempos. Assim foram preparados os tubos SUPELCO com meio de cultura, como já descrito e para eles foram repicados os isolados selecionados. Os tubos foram vedados, e incubados a 25 °C no escuro por 6 dias, para acumulação dos COVs. Em seguida, 1 ml de uma suspensão de 100 J<sub>2</sub> de *M. incognita* foi injetada no interior do microtubo e deixada a 25 °C por 0,5, 3, 6, 12 e 24 horas. Ao final de cada tempo de exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs, os frascos foram abertos e a suspensão de J<sub>2</sub> contida nos microtubos foi transferida para placa ELISA e contado o número de J<sub>2</sub> móveis e imóveis.

#### **2.5 Infectividade e reprodução de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* após exposição aos compostos orgânicos voláteis fúngicos.**

Para este ensaio foram utilizados também os mesmos nove isolados de fungos associados à madeira (PD8, PD10, PD12, PD13, PD14, PD21, PD22, PD27 e PD29) o qual se mostraram tóxicos a J<sub>2</sub> de *M. incognita* em teste anterior. Empregaram-se também tubos SUPELCO preparados com BDA como já descrito. No microtubo inserido no meio de cultura foi injetado 1 mL da suspensão contendo 600 J<sub>2</sub> de *M. incognita* e deixados expostos aos COVs por 24 horas. Então esses J<sub>2</sub> foram retirados do microtubo e dispersos em 4 mL de água destilada e inoculadas em mudas de

tomateiro, com 30 dias de idade, em sementeira de células com 75 cm<sup>3</sup> contendo substrato Plantmax®. Após a inoculação as sementeiras foram mantidas em casa de vegetação. A irrigação das mudas inoculadas foi realizada por aspersão com auxílio de um pulverizador manual sempre que necessário. O número de galhas e ovos por sistema radicular foi avaliado 30 dias após a inoculação.

Todos os três ensaios realizados foram repetidos para confirmação dos dados.

## **2.6 Estatística e análise dos dados**

Todos os ensaios anteriores foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições nas duas primeiras avaliações e cinco na última. Para a análise dos dados utilizou-se o programa Sisvar versão 4.6 para a realização da análise de variância (ANOVA). As médias de cada tratamento foram agrupadas e diferenciadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de significância.

## **2.7 Caracterização molecular dos isolados fúngicos**

### **2.7.1 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada em nove isolados fúngicos (PD8, PD10, PD12, PD13, PD14, PD21, PD22, PD27 e PD29) que demonstraram os melhores resultados. 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/ 1 L 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.

### 2.7.2 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'-TTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-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 a uma temperatura de desnaturação de 85 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos 94 °C por 95s, 52 °C por 60s, 72 °C por 60s e 95 °C por 70 s. A extensão final foi de 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.

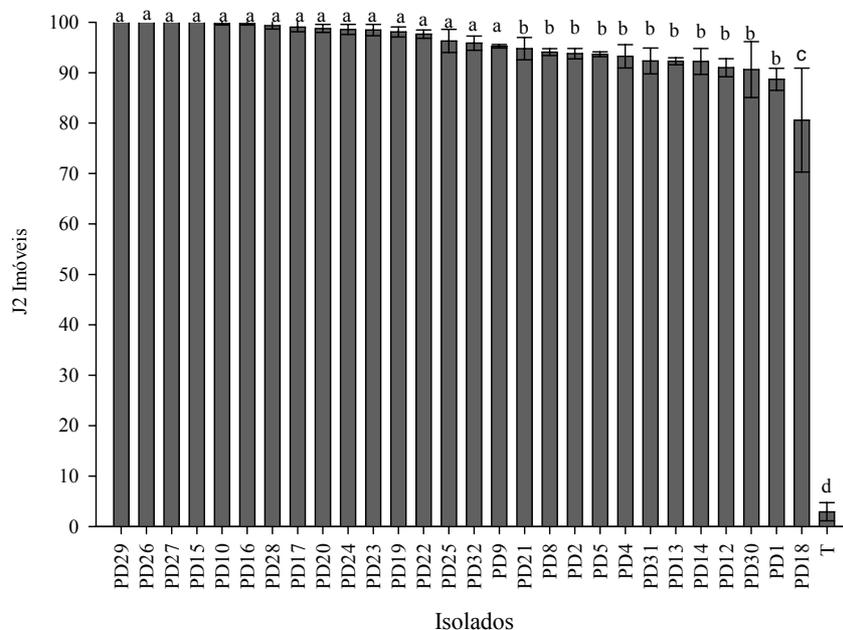
## **2.8 Análises dos fragmentos da região ITS**

O sequenciamento da região ITS foi realizado no Laboratório de Genômica 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 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)) 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 compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos associados à madeira a juvenis de segundo estágio de *M. incognita*.

Os COVs emitidos por todos os 28 isolados fúngicos associados à madeira causaram redução significativa na mobilidade de  $J_2$  de *M. incognita* variando de 80 a 100% em comparação com o controle ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 2). Desses isolados três grupos foram definidos pelo teste de Scott Knott (1974).

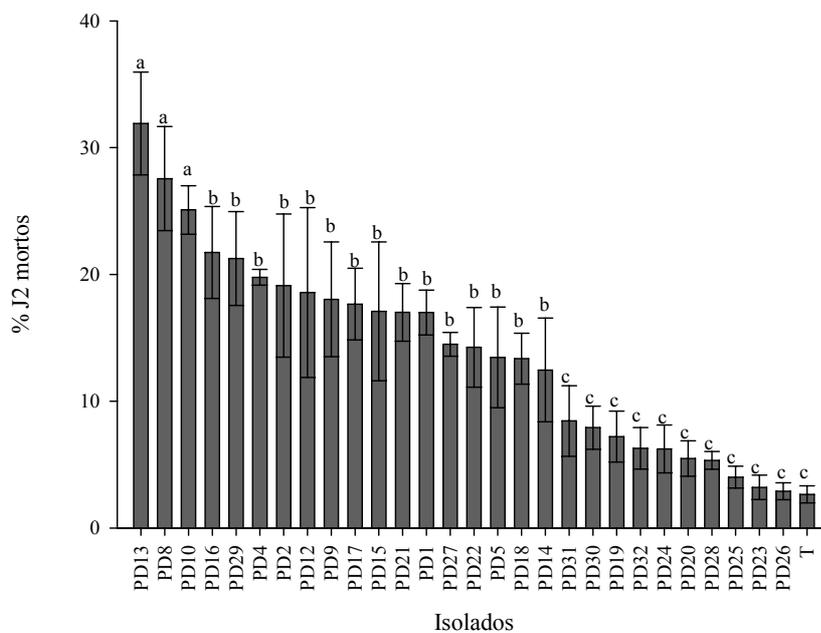


**Figura 2:** Porcentagem de juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) imóveis de *Meloidogyne incognita* submetidos a compostos orgânicos voláteis de diferentes isolados de fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de significância. T = Controle.

O primeiro grupo composto por 16 isolados (PD29, PD26, PD27, PD15, PD10, PD16, PD28, PD17, PD20, PD24, PD23, PD19, PD22, PD25, PD32 e PD9) causou imobilidade que variou de 100 a 95 %, enquanto que o

segundo grupo, composto por 11 isolados (PD21, PD8, PD2, PD5, PD4, PD31, PD13, PD14, PD12, PD30 e PD1), variou de 94 a 88%. No terceiro grupo o isolado PD18 causou imobilidade de 80% em relação à testemunha.

Entretanto a mortalidade, significativamente, diferente do controle causada pelos COVs fúngicos a J<sub>2</sub> de *M. incognita* variou de 3 a 32%. Os COVs dos isolados PD13, PD8 e PD10 proporcionaram maior número de J<sub>2</sub> mortos (25 a 32%). Porém os isolados PD16, PD29, PD4, PD2, PD12, PD9, PD17, PD15, PD21, PD27, PD22, PD5 e PD18 também causaram mortalidade significativa dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* comparando com o controle (P<0,05) (Figura 3).



**Figura 3:** Porcentagem de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) mortos de *Meloidogyne incognita* submetidos a compostos orgânicos voláteis de diferentes isolados de fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de significância. T = controle.

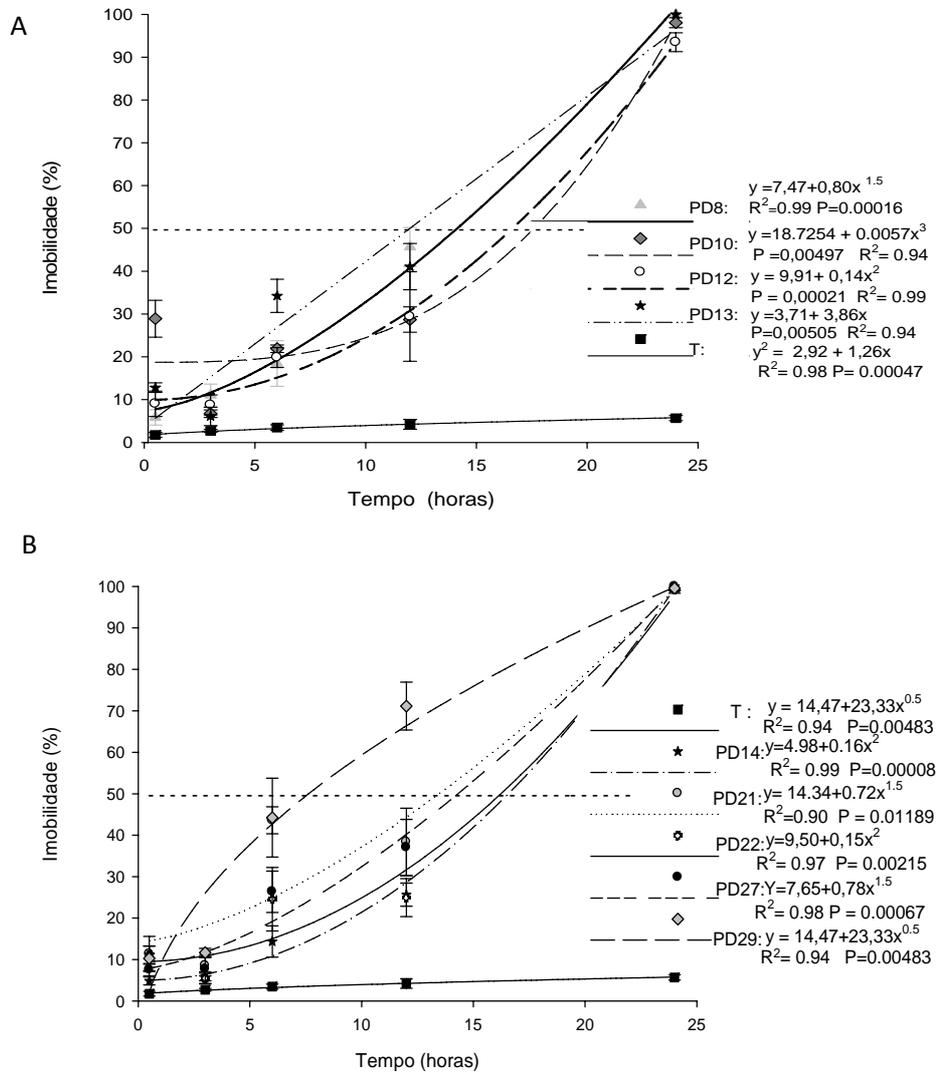
### **3.2 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis a juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* em diferentes períodos de exposição.**

Os diferentes tempos de exposição dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* aos COVs emitidos pelos isolados fúngicos PD8, PD10, PD12, PD13, PD14, PD21, PD22, PD27 e PD29 demonstraram porcentagem de imobilidade diferente ao longo de 24 horas de exposição. Por exemplo, 50% de imobilidade foi alcançado em tempos diferentes de exposição dos J<sub>2</sub> aos COVs dos fungos: PD8 = 14 horas, PD10 = 17 horas, PD12 = 16 horas, PD13 = 12, PD14 = 17 horas, PD21 = 13 horas, PD22 = 16 horas, PD27 = 15 horas e PD29 = 7 horas (FIGURA 4A e FIGURA 4B).

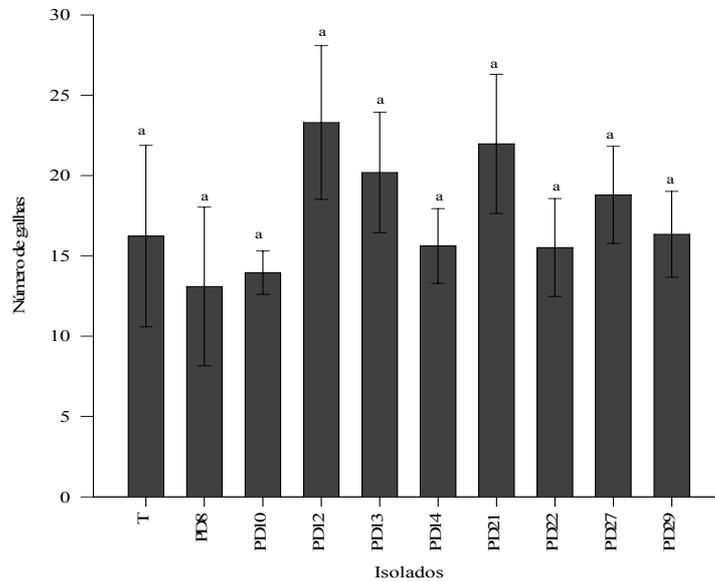
### **3.3 Infectividade e reprodução de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* após exposição aos compostos orgânicos voláteis fúngicos.**

A exposição dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* aos COVs dos isolados fúngicos associados à madeira PD8, PD10, PD12, PD13, PD14, PD21, PD22, PD27 e PD29 não afetou significativamente a infectividade em tomateiro ( $P > 0,05$ ) (Figura 5). Porém, o número de ovos foi significativamente reduzido pelas fêmeas resultantes dos J<sub>2</sub> expostos aos isolados PD8 (*Epicoccum nigrum*) e PD 29 (*Schizophyllum commune*) em 67 e 74%, respectivamente, comparado ao controle ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 6).

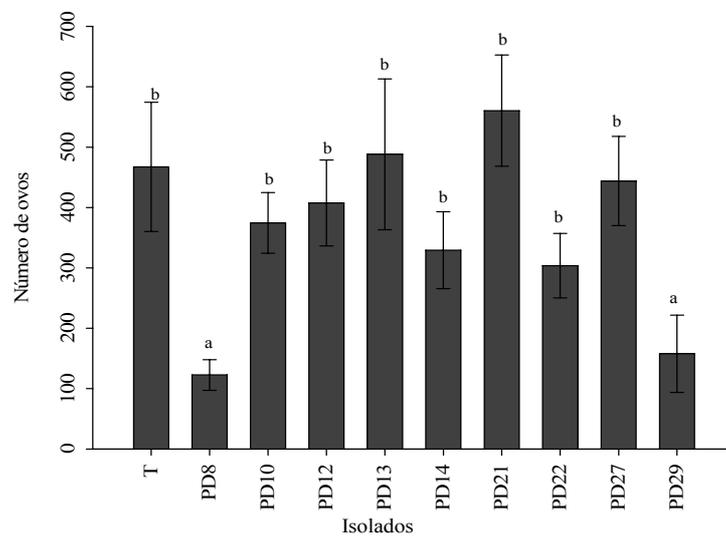
Foram obtidas sequências de tamanho aproximado de 650 pb para os nove isolados selecionados. Os isolados foram identificados, parcialmente, como pertencentes a duas classes fúngicas, Ascomycetes e Basidiomycetes de acordo com a maior similaridade com outras sequências depositadas no Genbank (TABELA 2).



**Figura 4** A) Porcentagem de imobilidade *Meloidogyne incognita* submetidos a COVs dos isolados PD8, PD10, PD12 e PD13 em diferentes tempos. B) Porcentagem de imobilidade *Meloidogyne incognita* submetidos a COVs dos isolados PD14, PD21, PD22, PD27 e PD29 em diferentes tempos. T= controle



**Figura 5:** Número de galhas de *Meloidogyne incognita* submetidos a COVs de isolados de fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de significância. T= Controle.



**Figura 6:** Número de ovos de *Meloidogyne incognita* submetidos a COVs de isolados de fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott de 5% de significância. T= Controle.

TABELA 2: Identificação parcial dos isolados selecionados utilizando-se a região ITS do DNA ribossomal.

Código do isolado	Gênero e/ou espécie	Similaridade (%)*
PD8	<i>Epicoccum nigrum</i>	99
PD10	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	99
PD12	Não identificado	-
PD13	<i>Schizophyllum commune</i>	91
PD14	<i>Phanerochaete chysosporium</i>	98
PD21	<i>Schizophyllum commune</i>	99
PD22	<i>Nigrospora sp.</i>	99
PD27	<i>Lasioplodia sp.</i>	99
PD29	<i>Schizophyllum commune</i>	99

\*Porcentagem de similaridade com isolados depositados no GenBank<sup>®</sup>

#### 4. DISCUSSÃO

Os COVs emitidos por todos os fungos aqui estudados causaram imobilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Analogamente, outros grupos de pesquisadores têm demonstrado imobilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* causadas pela exposição à COVs emitidos por fungos (GRIMME et al., 2007; FREIRE et al., 2012)

Freire et al (2012) em avaliação *in vitro* da atividade de COVs de isolados de *F. oxysporum* sobre *M. incognita*. Os autores mostraram efeitos positivos dos COVs produzidos por esse fungo no controle do nematoide, sendo que os isolado 20a e 21 de *F. oxysporum* foram os mais ativos. Embora tenha sido alta a imobilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* neste trabalho, a mortalidade foi baixa chegando ao máximo de 32% (Figura 2). Níveis bem mais elevados de mortalidade de *M. incognita* foram demonstrados por Freire et al. (2012) causada por COVs emitidos por fungos isolados da rizosfera cafeeira. Riga, Lacey e Guerra (2008) também demonstraram propriedades nematicidas dos COVs do fungo *M. albus* contra nematoides. Testando os COVs produzidos pelo fungo, constataram, mortalidade de *Paratrichodorus allius*, *Pratylenchus penetrans* e *M. chitwoodi* variando de 82 a 95%.

A imobilidade gradativa e rápida dos J<sub>2</sub> *M. incognita* nas primeiras horas de exposição aos COVs dos fungos associados à madeira e imobilidade total às 24 horas de exposição concorda com os dados obtidos por Gu et al. (2007) onde constataram diminuição gradativa de *Bursaphelenchus xylophilus* e *Panagrellus redivivus* entre 1 e 12 horas e imobilidade total desses nematoides em 24 horas de exposição. Grimme et al. (2007) também observaram redução na mobilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* em diferentes tempos. Essa imobilização ocorreu a partir de 24, 72 e 168 horas de exposição aos COVs emitidos pelo fungo *M. albus*, sendo de 31, 74 e 100% respectivamente.

A imobilidade e mortalidade de J<sub>2</sub> *M. incognita*, demonstrada em teste *in vitro*, no presente estudo, não afetaram a infectividade dos J<sub>2</sub> quando inoculados em tomateiro. Entretanto, Freire et al. (2012) constataram alta mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* causada por COVs de *Fusarium oxysporum* reduzindo, significativamente, as galhas em raízes quando os J<sub>2</sub> a eles expostos foram inoculados em tomateiro. Huang et al. (2010) também observaram redução no número de galhas e ovos de *M. incognita* quando submetidos aos COVs de *Bacillus megaterium* YFM3.25. Metabólitos produzidos por *B. megaterium* também causaram uma redução significativa do número de galhas radiculares e de ovos de nematoides de *M. exigua* em estudo realizado por Oliveira et al. (2007). Riga, Lacey e Guerra (2008), utilizando uma formulação do fungo *M. albus* misturada ao solo em recipiente plástico hermeticamente fechado, observaram que as populações de *P. allius*, *P. penetrans*, *M. chitwood* e *M. hapla* foram reduzidas entre 85% e 100% nas raízes, porém no solo, a redução variou entre 56% e 100%.

Embora os COVs das espécies *Epicoccum nigrum* (PD8) e *Schizophyllum commune* (PD29) não afetaram a infectividade dos J<sub>2</sub> *M. incognita* a eles expostos e inoculados em tomateiro, a reprodução foi, significativamente, reduzida nesse trabalho. A exposição aos COVs pode ter afetado a fisiologia do J<sub>2</sub> impedindo a sua reprodução. Como os ovos constituem a principal forma de sobrevivência de *Meloidogyne sp.* no campo (STARR; JEGGER, 1985), afetando a reprodução do nematoide, a população do próximo ciclo pode ser comprometida e, conseqüentemente, pode ocorrer uma redução dos prejuízos causados por esse patógeno.

Não foram encontrados na literatura estudos que envolvam tais fungos no controle de *M. incognita*. Estudos adicionais deverão ser cuidadosamente, conduzidos para determinar o potencial dos fungos utilizados neste estudo, principalmente os isolados PD8 e PD29, e os metabólitos produzidos pelos mesmos para o controle de espécies de *Meloidogyne*. Além disso é importante identificar as principais moléculas envolvidas nos efeitos dos COVs 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 nematoides e de outros fitopatógenos de importância econômica.

## 5.0 CONCLUSÕES

Os isolados de fungos associados à madeira emitem COVs tóxicos que causaram imobilidade dos J<sub>2</sub> *Meloidgyne incognita*.

Os COVs dos isolados fúngicos causam baixa mortalidade à J<sub>2</sub> de *Meloidgyne incognita*.

A imobilidade de J<sub>2</sub> de *Meloidgyne incognita* expostos aos COVs dos isolados fúngicos aumenta de acordo com o tempo de exposição e o isolado fúngico.

Os isolados PD29 e PD8 reduzem o número de ovos formados em tomateiro, porém não reduzem o número de galhas formadas.

Os isolados PD8 e PD29 foram identificados como *Epicoccum nigrum* e *Schizophyllum commune* respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxico em forma de chumbinho é banido do mercado brasileiro**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/11/05/agrotoxico-em-forma-de-chumbinho-e-banido-do-mercado-brasileiro>>. Acesso em: 18 fev. 2013.
- AHARONI, A. et. al. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant Cell**, Rockville, v.15, n.12, p. 2866-2884, Dec. 2003.
- ARAB, A.; BENT, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 151-158, mar. 2006.
- ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defence. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1734, n. 2, p. 91-111, May 2005.
- ARIMURA, G. et al. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. **Biochemical Systematic and Ecology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1049-1061, Nov. 2001.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553-555, mar. 1981.
- BOTELHO, A. O. **Fatores envolvidos na supressividade de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro**: nova técnica para análise de compostos voláteis tóxicos a fitonematoide. 2010. 98 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA, R. M. Controle de fito nematoides por meio de bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1998. p. 285-327.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Revue Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, 2002.
- CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v. 160, n. 6, p. 99-127, Oct. 2002.

- DIX, N. J.; WEBSTER, J. **Fungal ecology**. London: Chapman & Hall, London, 1995. 549 p.
- FERRAZ, S. et al. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Viçosa, MG: UFV, 2010. 304 p.
- FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, Hanover, 2012. In press.
- 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**, Quebec, v. 91, n. 2, p. 220-225, Feb. 2007.
- GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.
- HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 3, p. 417-422, Mar. 2010.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, Dec. 1973.
- KESSELER, A. et al. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentate* and *Nicotiana attenuate*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3553-3558, Aug. 2001.
- LIMA, A. O. **Biofumigação do solo com Brassica rapa para o controle de fito nematoides**. 2006. 56 p. Dissertação (Mestrado Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- NEVES, W. S. et al. Atividade nematicida de extratos botânicos de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), mostarda (*Brassica campestris*) e alho (*Allium sativum*) sobre o nematóide das galhas, *Meloidogyne javanica*, em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 4, p. 255-261, Oct. 2009.
- OLIVEIRA, D. F. et al. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 119, n. 4, p. 477-479, Dec. 2007.

RIGA, E.; LACEY, L. A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, San Diego, v. 45, n.3, p. 380-385, June 2008.

ROSECKE, J.; KONIG, W. A. Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. **Phytochemistry**, New York, v. 54, n. 6, p. 603-610, July 2000.

SASSER, J. N.; CARTER, C. C. Overview of the international *Meloidogyne* project (1975-1984). In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne: biology and control**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. v. 1, p.19-24.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on nematology**. Maryland: Society of Nematologists, 1987. p. 7-14.

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.

STARR, J. L.; JEGER, M. J. Dynamics of Winter Survival of Eggs and Juveniles of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **Journal of Nematology**, Orlando, v.17, n. 3, p. 252-256, July 1985.

YE, W. E. et al. Studies on fungi associated with *Bursaphelenchus xylophilus* on *Pinus massoniana* in Shenzhen, China. **Afro-Asian Journal of Nematology**, London, v. 3, n. 1, p. 47-49, 1993.

WHEATHEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediate bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, n. 1/4, 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.

WHITEHEAD, A. G. **Plant nematode control**. Oxon: CAB International, 1998. 384 p.

### CAPÍTULO 3

#### COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR FUNGOS ASSOCIADOS À MADEIRA TÓXICOS A *Xanthomonas* *axonopodis* e *Cylindrocladium candelabrum*

#### RESUMO

Objetivou-se, com esse trabalho selecionar isolados de fungos de podridão de madeira produtores de COVs tóxicos à *Xanthomonas axonopodis* e *Cylindrocladium candelabrum*, patógenos causadores de mancha foliar na cultura do eucalipto. Para isso, utilizaram-se tubos SUPELCO® SPME de 80x28 mm. Nos tubos foram adicionados 15 mL de agar-água e sobre ele mais 6 mL de meio batata dextrose ágar (BDA). Um microtubo esterilizado de 1,5 mL foi introduzido até a sua metade no meio BDA. Adicionaram-se dois discos de micélio de 2 mm de diâmetro retirados das bordas das colônias na superfície do BDA em posições opostas e em seguida, vedou-se o tubo com Parafilm®. Utilizaram-se, como testemunha, tubos contendo apenas meio de cultura sem cultivo fúngico. Os tubos foram encubados por seis dias a 25 °C. Após incubação com o auxílio de uma seringa, injetou-se dentro do microtubo, 1 mL de uma suspensão bacteriana de *X. axonopodis*. Após 48 horas o microtubo contendo a suspensão bacteriana foi retirado e foram feitas seis diluições utilizando-se a técnica de microgota. Após 24 h avaliou-se o número de colônias formadas na última diluição. Para *C. candelabrum*, com o auxílio de uma seringa, 1 mL de uma suspensão de 10<sup>4</sup> conídios/mL do fungo foi injetada dentro do microtubo. Após 8 horas avaliou-se a porcentagem de conídios germinados e não germinados. Foram aspergidos em folhas de eucalipto, 5 mL de uma suspensão de conídios de *C.candelabrum* submetidos aos COVs fúngicos de nove isolados fúngicos e avaliado o número de lesões/folha. Três grupos de isolados diferiram, significativamente, da testemunha (P<0,05), sendo que os isolados do primeiro grupo apresentaram de 75 a 59% de redução no número de colônias bacterianas. No experimento com *C.candelabrum* os COVs inibiram a germinação de conídios em até 88,6% comparando com a testemunha (P<0,05). Todos os isolados selecionados foram eficientes em reduzir a infecção de *C.candelabrum* em mudas de eucalipto em comparação com a testemunha (P<0,05).

Palavras-chave: Mancha foliar, *Eucalyptus*, *Xanthomonas axonopodis*, Controle biológico

### CHAPTER 3

#### VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS PRODUCED BY FUNGI ASSOCIATED WITH WOOD AND TOXIC TO *Xanthomonas* *axonopodis* AND *Cylindrocladium candelabrum*

##### ABSTRACT

This work aimed at selecting wood rot fungal isolates, producers of VOCs toxic to *Xanthomonas axonopodis* and *Cylindrocladium candelabrum*, pathogens which cause the leaf spot in eucalyptus culture. In order to do this, we used SUPLECO®SPME 80x28 mm tubes. In the tubes we added 15 mL of agar-water and, over it, 6 mL more of potato dextrose agar (PDA) medium. A sterilized 1.5 mL micro tube was introduced until its middle in the PDA. We then added two mycelium discs of 2 mm of diameter removed from the edges of the colonies on opposite positions of the PDA surface and, subsequently, sealed the tube with Parafilm®. As witness we used tubes containing only the culture medium, without the fungal cultivation. The tubes were incubated for six days at 25 °C. After the incubation, we injected 1 mL of *X. axonopodis* bacterial suspension into the micro tube with a syringe. After 48 hours, the micro tube containing the bacterial suspension was removed and six dilutions were made using the microdrop technique. After 24 hours, we evaluated the number of colonies formed in the last dilution. For the *C. candelabrum*, 1 mL of a 10<sup>4</sup> conidia/mL of the fungus suspension was injected into the micro tube. After 8 hours, we evaluated the percentage of germinated and not germinated conidia. We sprayed 5 mL of a *C. candelabrum* conidia suspension, submitted to fungal VOCs of nine isolates, on eucalyptus leaves, and evaluated the number of lesions/leaf. The isolate groups significantly differed from the witness (P<0.05), with the isolates from the first group presenting from 75 to 59% reduction in the number of bacterial colonies. In the experiment with *C. candelabrum*, the VOCs inhibited conidia germination in up to 88.6%, compared to the witness (P<0.05). All the selected isolates were efficient in reducing *C. candelabrum* infection in eucalyptus seedlings, compared to the witness (P<0.05).

Keywords: Leaf spot, *Eucalyptus*, *Xanthomonas axonopodis*, Biological control.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as doenças que atacam a cultura do eucalipto em condições de viveiro, as causadas por *Xanthomonas axonopodis* e *Cylindrocladium sp.* são consideradas, atualmente, as mais importantes. A bactéria *X. axonopodis* causa mancha foliar e desfolha, já espécies de *Cylindrocladium*, além de mancha foliar causam, também, podridão-de-estacas e "damping-off". Ambas atacam a cultura do eucalipto desde a fase de viveiro até os plantios adultos sendo predominante nos viveiros florestais (GONÇALVES, 2003; ALFENAS et al., 2004).

O controle de doenças na eucaliptocultura é feita, basicamente, pelo uso de clones resistentes e em condições emergenciais pelo o uso de fungicidas. Entretanto o número limitado ou inexistente de produtos registrado para controle destas doenças torna oportuna a busca de novos métodos de biocontrole (GONÇALVES, 2003).

Fungos associados à madeira, principalmente fungos de podridão, podem ser promissores no controle de fitopatógenos, uma vez que ao liberarem enzimas que reagem com o substrato, produzem diferentes metabólitos. Alguns desses fungos produzem ou induzem 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).

Entre esses metabólitos destacam-se os compostos orgânicos voláteis (COVs) que devido as característica de fácil penetração pela membrana e distribuição eficiente pela porosidade do solo, aumentam a sua área de influência e, conseqüentemente, melhoram sua eficácia no controle de fitopatógenos (DUDAREVA et al., 2006). Essa eficiência em controlar organismos tem sido mostrada em várias pesquisas (KESSELMEIER;

STAUDT, 1999; LEFT; FIERER, 2008; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008; FREIRE ET al., 2012).

Segundo Kai et al. (2009) os COVs produzidos por microrganismos servem como infoquímicos para comunicação inter e intraorganismos, como interferência de sinais de comunicação célula-célula, como uma possível válvula de escape de carbono e como inibidor ou promotor do crescimento de agentes.

Portanto, para comprovar o efeito de COVs sobre fitopatógenos objetivou-se, neste trabalho, selecionar isolados de fungos associados à madeira produtores de COVs tóxicos à *X. axonopodis*, selecionar isolados de fungos associados à madeira produtores de COVs tóxicos *C. candelabrum* e avaliar a infectividade de conídios de *C. candelabrum*, tratados com COVs dos fungos associados à madeira, em mudas de eucalipto.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Preparo e manutenção dos isolados de fungos associados à madeira.**

Foram utilizados nos ensaios 28 isolados de fungos associados à madeira, coletados de diferentes substratos (árvores e tocos em decomposição) nos fragmentos florestais do campus da Universidade Federal de Lavras (TABELA 1). Para o isolamento dos fungos, fragmentos foram retirados dos corpos de frutificação e/ou de madeiras em decomposição e desinfestados superficialmente em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito 5% e eliminado o excesso de hipoclorito com água esterilizada. Após desinfestação superficial, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo Batata Dextrose Agar (BDA Himedia®) e incubados a 25 °C por sete dias. Posteriormente, os isolados foram armazenados por três processos diferentes, o primeiro foi em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, o segundo em glicerol 15% na temperatura de -80 °C e o terceiro pelo método de castellani em temperatura ambiente.

### **2.2. Atividade de compostos orgânicos voláteis na toxicidade à *Xanthomonas axonopodis*.**

A atividade dos COVs no crescimento de colônias de *X. axonopodis*, isolado de mudas de eucalipto, foi testada empregando-se a técnica do tubo SUPELCO descrita por Botelho (2010). Nos tubos (SUPELCO® SPME de 80 x 28 mm) foram adicionados 15 mL de agar-água e sobre ele mais 6 mL de BDA em seguida introduziu-se um microtubo esterilizado de 1,5 mL até a metade no meio BDA. Dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias e depositados em posições opostas sobre o

meio de cultura BDA e em seguida, vedou-se o com Parafilm<sup>®</sup>. Como testemunha utilizou-se de tubos contendo apenas meio de cultura sem cultivo fúngico. Após seis dias uma suspensão bacteriana de  $10 \times 10^9$  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 seis diluições utilizando-se a técnica de microgota (ROMEIRO, 2001). Após diluição, adicionou-se 10 µl das quatro últimas diluições da suspensão bacteriana em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKET, 1970). Após 24 h avaliou-se o número de colônias formadas na última diluição.

### **2.3. Atividade de COVs sobre a germinação de conídios de *Cylindrocladium candelabrum*.**

A atividade dos COV's na germinação dos conídios de *C. candelabrum* foi testada empregando-se a técnica do tubo SUPELCO descrita por Botelho (2010). Nos tubos (SUPELCO<sup>®</sup> SPME de 80x28 mm) foram adicionados 15 mL de agar-água e sobre ele mais 6 mL de BDA em seguida introduziu-se um microtubo esterilizado de 1,5 mL até a metade no meio BDA. Dois discos de micélio, dos fungos associados à madeira, de 5 mm de diâmetro retirados das bordas das colônias foram depositados em posições opostas sobre o meio de cultura BDA e em seguida, vedou-se o tubo com Parafilm<sup>®</sup>. Como testemunha utilizou-se de tubos contendo apenas meio de cultura sem cultivo fúngico. Após seis dias, uma suspensão de 1 mL contendo  $2 \times 10^4$  conídios 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 8 horas. Após

esse período, a suspensão de conídios foi retirada do microtubo e adicionada em Câmara de Neubauer para quantificação em microscópio óptico dos conídios germinados e não germinados.

Tabela 1. Isolados fúngicos de diferentes substratos coletados nas cidades de Lavras MG e Silveirânia, MG.

Código do isolado	Data de coleta	Cidade, Estado	Local
PD1	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD2	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD4	26/08/2011	Lavras, MG	Campus, UFLA
PD5	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD8	26/08/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD9	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD10	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD12	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD13	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD14	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD15	21/10/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD16	21/10/2011	Silveirânia, MG	Silveirânia, MG
PD17	21/10/2011	Silveirânia, MG	Silveirânia, MG
PD18	16/09/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD19	18/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD20	12/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD21	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD22	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD23	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD24	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD25	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD26	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD27	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD28	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD29	07/12/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD30	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD31	25/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA
PD32	07/11/2011	Lavras, MG	Campus UFLA

#### **2.4. Efeito dos COVs na infecção de conídios de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de eucalipto.**

Para este ensaio foram selecionados nove isolados de fungos associados à madeira (PD8, PD10, PD12, PD13, PD14, PD21, PD22, PD27 e PD29) o qual mostraram toxicidade a *C. candelabrum* em teste anterior. Empregou-se a técnica desenvolvida por Botelho (2010) descrita no item “2.3”. 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 dispersa em 4 mL de água destilada.

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 25kg de substrato. Após 30 dias do transplante das mudas, 5 mL de suspensão de  $2 \times 10^4$  conídios, tratados com COVs, foram pulverizados com auxílio de um pulverizador 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 tratados com os COVs.

#### **2.5 Delineamento estatístico e análise dos dados**

Os dois primeiros ensaios deste capítulo, realizados com *X. axonopodis* e *C. candelabrum* foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições e 28 isolados fúngicos. No ensaio de infecção de conídios *C. candelabrum* em mudas de eucalipto, utilizou-se DIC com cinco repetições e nove isolados fúngicos. Para a análise dos dados utilizou-se o programa Sisvar versão 4.6 para a

realização da análise de variância (ANOVA). As médias de cada tratamento foram agrupadas e diferenciadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de significância.

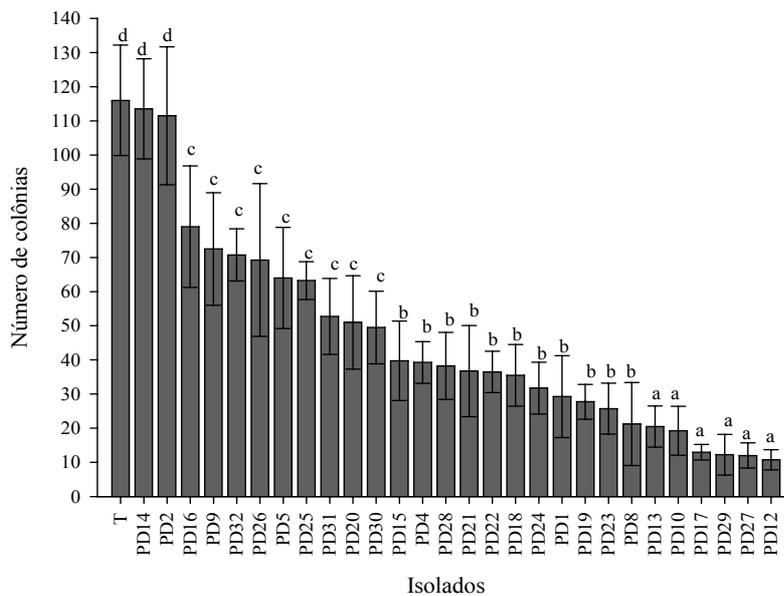
## **2.6 Caracterização molecular dos isolados fúngicos.**

A caracterização molecular dos isolados fúngicos foi realizado de acordo com o descrito no item 2.7 a 2.8 do capítulo 2.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Atividade de compostos orgânicos voláteis na toxicidade à *Xanthomonas axonopodis*.

O número de ufc de *X. axonopodis*, após exposição por 48 horas aos COVs dos fungos de podridão de madeira reduziu, significativamente, em relação à testemunha. Constatou-se a formação de quatro grupos (FIGURA 1) de isolados que diferiram da testemunha pelo teste de Scott e Knott ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 1:** Número de colônias de *Xanthomonas axonopodis* formadas por diferentes isolados de fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de significância. T= Controle.

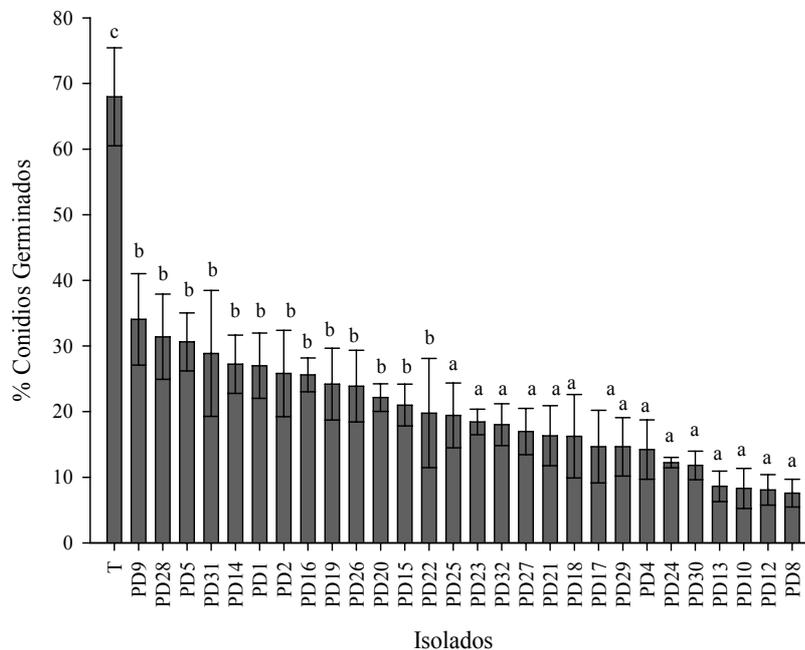
O primeiro grupo composto por seis isolados (PD12, PD27, PD29, PD17, PD10 e PD13) apresentou de 75 a 59% de redução no número de

colônias bacterianas em relação à testemunha. A redução do número de colônias do segundo grupo, composto por dez isolados (PD8, PD23, PD19, PD1, PD24, PD18, PD21, PD28, PD4 e PD15), variou de 53,89 a 42,1%. O terceiro grupo formado por nove isolados (PD30, PD20, PD31, PD25, PD5, PD26, PD32, PD9 e PD16) que variou de 35,46 a 18,9%. Dois isolados de fungos associados à madeira em decomposição (PD14 e PD2) agruparam-se no quarto grupo juntamente com a testemunha.

### **3.2 Atividade de COVs sobre a germinação de conídios de *Cylindrocladium candelabrum*.**

O número de conídios de *C. candelabrum* germinados, após exposição por 8 horas aos COVs dos fungos associados à madeira reduziu, significativamente, em relação à testemunha. Observou-se a formação de dois grupos (FIGURA 2) de isolados que diferiram da testemunha pelo teste de Scott e Knott ( $P \leq 0,05$ ).

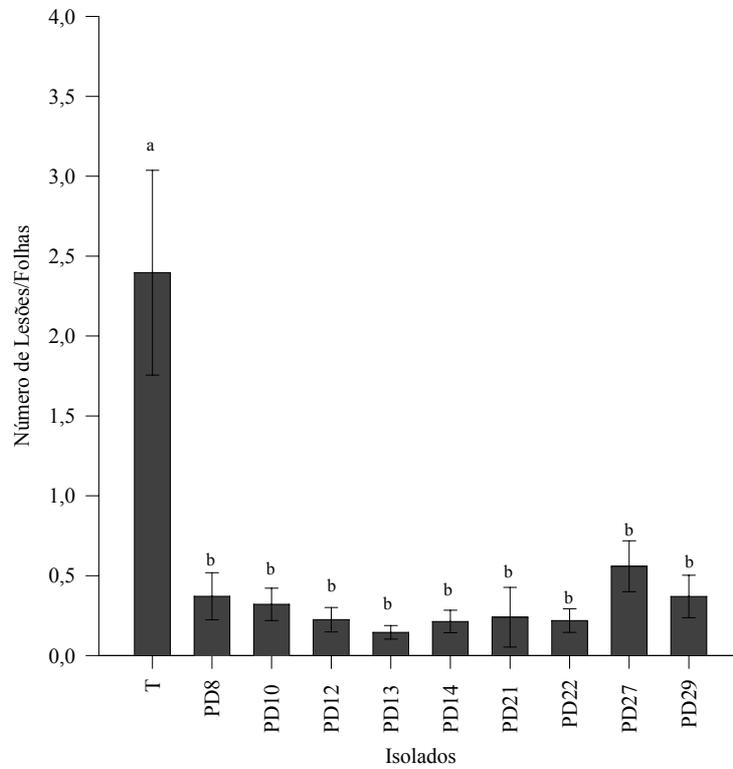
O primeiro grupo composto por 15 isolados (PD8, PD12, PD10, PD13, PD30, PD24, PD4, PD29, PD17, PD18, PD21, PD27, PD32, PD23 e PD25) inibiu a germinação de conídios em 88,6 a 72,8 %, enquanto que o número de conídios do segundo grupo, composto por 13 isolados (PD22, PD15, PD20, PD26, PD19, PD16, PD2, PD1, PD14, PD31, PD5, PD28 e PD29), variou de 70 a 50% em relação à testemunha.



**Figura 2:** Número de conídios germinado de *Cylindrocladium candelabrum* submetidos a COVs de diferentes isolados de fungos associados à madeira. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de significância.

### 3.3 Efeito dos COVs na infecção de conídios de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de eucalipto.

Em relação à infecção de *C. candelabrum*, verificou-se que os nove isolados fúngicos selecionados (PD8, PD10, PD12, PD13, PD14, PD21, PD22, PD27 e PD29) foram eficientes e reduziram, significativamente, o número de lesões nas folhas onde foi aplicada a suspensão quando comparada com a testemunha ( $P \leq 0,05$ ). O número de lesões variou de 0,14 a 0,55 lesões/folha, enquanto que a testemunha apresentou 2,39 lesões/folhas, reduzindo em 77 a 94% o número de lesões/folha em relação à testemunha.



**Figura 3:** Número médio de lesões por folha de eucalipto, inoculadas com suspensão de conídios de *Cylindrocladium candelabrum* submetidos aos COVs de nove isolados de fungos associados à madeira . Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de significância.

#### 4. DISCUSSÃO

A redução do crescimento das colônias bacterianas, observada no presente trabalho, demonstra a importância dos COVs produzidos pelos fungos associados à madeira. Analogamente, alguns pesquisadores vêm demonstrando o efeito de COVs fúngicos no controle de bacterioses (MITCHELL et al., 2010; MELO et al., 2012), apesar de a maioria das pesquisas envolverem COVs produzidos por isolados bacterianos sobre fungos, em função dos muitos compostos voláteis (alcoóis, aldeídos, cetonas, sulfetos e amônia) que produzem (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003).

Melo et al. (2012), ao avaliarem a inibição de *Xanthomonas 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%.

Mitchell et al. (2010) também verificaram efeito inibitório e letal de COVs do fungo *Muscodora crispans* sobre bactérias que causam graves problemas de saúde aos seres humanos e a plantas, sendo que *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, o agente causal do cancro cítrico, teve seu crescimento considerado 100% negativo comparado com a testemunha, quando submetido aos COVs de *M.crispans*. Da mesma forma, doses dos compostos voláteis 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, identificados dentre as substâncias liberadas pela linhagem CR-1 de *Saccharomyces cerevisiae* com atividade antifúngica foram avaliadas por Balbi-Peña et al. (2012) no

controle do crescimento *in vitro* de *X. vesicatoria* que observaram que nas doses de 25 e 50 µL, todos os tratamentos controlaram 100% o crescimento de *X. vesicatoria*.

Em relação à inibição da germinação de *C. candelabrum* por COVs fúngicos, constatou-se, nesse estudo, que houve efeito fungistático dos COVs produzidos pelos fungos testados. 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 maduras. Da mesma forma, Chitarra et al. (2004), relataram que conídios de *Penicillium paneum*, também apresentaram baixa germinação devido à produção de um auto-inibidor volátil (1-Octen-3-ol) que também apresenta atividade sobre fungos de outros gêneros. Segundo os autores, o composto é produzido pelo conídio e liberado na atmosfera a fim de inibir a germinação de conídios prematuros até que as condições ambientais apropriadas prevaleçam, sendo assim considerado um auto inibidor volátil muito eficiente.

Neste estudo, constatou-se que os COVs produzidos por fungos associados à madeira são capazes de inibir a infecção de conídios de *C. candelabrum*, reduzindo o número de folhas lesionadas. Provavelmente os COVs fúngicos afetaram o poder germinativo de *C. candelabrum* impedindo a penetração e, ou a colonização dos tecidos das plantas 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. candelabrum*. Os estudos que relatam a aplicação de COVs *in vivo* envolvem a micofumigação de frutos e do solo. Park et al. (2010) por exemplo, testaram compostos voláteis produzidos por *Nodulisporium* sp. contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*. Neste estudo houve supressão de 35 e 68% das lesões causadas por *B. cinerea* e 38 a 76% das lesões causadas por *P. expansum* após micofumigação em maçãs. Voláteis de *M. albus* também mostram-se

eficientes no controle de *Penicillium digitatum* e *Geotrichum citri-aurantii* em maçãs (MERCIER; SMILANICK, 2005). Da mesma forma, Arrebola et al. (2010), estudando o efeito de compostos voláteis produzidos por bactérias, contra podridão pós-colheita em citros, verificaram redução significativa na incidência e severidade da doença em frutos biofumigados com espécies de *Bacillus*.

Não existem estudos sobre a ação de COVs produzidos pelos fungos identificados, nesse estudo, em patógenos florestais. Atualmente as fungos e bactérias constituem um dos maiores problemas em condições de viveiro de eucalipto, por não existir medidas de controle químico ou biológico eficientes. O controle é feito, na maioria das vezes, pelo manejo de irrigação e pelo espaçamento de mudas, que nem sempre é eficiente. Dessa maneira, esse estudo demonstra potencial no sentido de sintetizar novos produtos e moléculas a partir de COVs fúngicos que podem agir como indutores de resistência, controle biológico ou como produtos fungicidas.

## 5. CONCLUSÕES

Os COVs produzidos por fungos associados à madeira são tóxicos a *Xanthomonas axonopodis* reduzindo o número de colônias formadas em até 75%.

Os COVs produzidos por fungos associados à madeira inibem a germinação de conídios de *Cylindrocladium candelabrum* em até 88,6%.

Todos os isolados selecionados são eficientes em reduzir a infecção de *C. candelabrum* em mudas de eucalipto.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária/UFV, 2004.
- ALONSO, S. K. et al. Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão-branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 1, p. 145-155, jan. 2007.
- ARREBOLA, M. B. et al. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. **Biology Control**, San Diego, v. 53, n. 1, p. 122-128, Apr. 2010.
- BALBI-PEÑA, M. I. et al. Efeito de 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol no crescimento in vitro de *Xanthomonas vesicatoria*. **Tropical Plant Pathology**, Manaus, v. 38, p. 426, ago. 2012. Suplemento.
- BOTELHO, A. O. **Fatores envolvidos na supressividade de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro**: nova técnica para análise de compostos voláteis tóxicos a fitonematoide. 2010. 98 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- CHITARRA, G. S. et al. Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-Octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 70, n. 5, p. 2823-2829, May 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.
- 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.
- FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, Hanover, 2012. In press.
- GONÇALVES, R. C. **Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil**. 2003. 94 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

- 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.
- KAI, M. et al. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, n. 6, p. 1001-1012, Jan. 2009.
- KESSELMEIER, J.; STAUDT, M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. **Journal of Atmospheric Chemistry**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 23-88, May 1999.
- LEFF, J. W.; FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology & Biochemistry**, Berlin, v. 40, n. 2, p. 1629-1636, Mar. 2008.
- MADIGAN, M. M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. E. **Brock biology of microorganisms**. New York: Prentice Hall, 2003. 1104 p.
- 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.
- MERCIER, J.; SMILANICK, J. L. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. **Biological Control**, v. 32, n. 3, p. 401-407, Mar. 2005.
- MITCHELL, A. M. et al. Volatile Antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, New York, v. 156, p. 270-277, Jan. 2010.
- MORADALI, M. F. et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 7, p. 701-724, 2007.
- MOREIRA, M. T. et al. Reevaluation of the manganese requirement for the biobleaching of kraft pulp by white rot fungi. **Bioresource Technology**, New York, v. 70, n. 3, p. 255-260, Dec. 1999.
- PARK, M. S. et al. Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest disease of apple. **Plant Pathology Journal**, London, v. 26, n. 3, p. 253-259, May 2010.

RIGA, E.; LACEY, L. A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, San Diego, v. 45, n. 3, p. 380-385, June 2008.

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.

SCHALCHLI, H. et al. Antifungal activity of volatile metabolites emitted by mycelial cultures of saprophytic fungi. **Chemistry and Ecology**, Berlin, v. 27, n. 6, p. 503-513, Dec. 2011.

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.

STROBEL, G. A. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, New York, v.147, p. 2943-2950, 2001.