

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISANDRA SANTOS FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Curvularia* spp. ENDOFÍTICOS
DE MILHO (*Zea mays* L.) POR PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

Curitiba

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LISANDRA SANTOS FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Curvularia* spp. ENDOFÍTICOS
DE MILHO (*Zea mays* L.) POR PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Kava-Cordeiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Patricia Dalzoto

Curitiba

2010

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Ferreira, Lisandra Santos

Caracterização de isolados de *Curvularia* spp. endofíticos de milho (*Zea mays* L. por parâmetros morfológicos e moleculares. / Lisandra Santos Ferreira. – Curitiba, 2010.
118 f. ; 30cm.

Orientadora: Vanessa Kava-Cordeiro

Co-orientadora: Patricia Dalzoto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Fungos - Genética 2. Fungos patogênicos 3. Milho I. Título II. Kava-Cordeiro, Vanessa III. Dalzoto, Patricia IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 589.2

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força e entendimento quando as coisas pareciam não dar certo, mas principalmente pelas horas em que tudo correu bem.

Agradeço especialmente ao meu querido marido Pablo pelo amor e carinho nos momentos difíceis e também pela grande paciência e apoio.

Agradeço aos meus pais por me darem amor, condições de estudo e grande apoio em todas as horas.

Aos meus queridos irmãos Carlos e Heitor pelo apoio, incentivo e suporte técnico no meu computador nas horas mais críticas.

A toda minha família pelo apoio e incentivo.

A minha orientadora Vanessa que sabe dar conselhos nas horas certas e com isso acalmar ânimos nos momentos ruins, pela grande amizade e confiança em me orientar.

A minha co-orientadora Patrícia Dalzoto pelas contribuições que enriquecem o trabalho.

Aos amigos de laboratório Danyelle Stringari e Douglas Adamoski pela grande ajuda, apoio nos experimentos e dia-a-dia no laboratório.

Ao meu amigo Douglas Montenegro pela amizade e convivência no dia-a-dia do laboratório.

A minha amiga Angela que esteve comigo desde o início do trabalho.

Aos amigos: Andressa Bini, Caroline Andrade, Eduardo Goulin, Elisandro Bruscato, Fabiana Tonial, Josiane Figueiredo, Juliana Marta, Luciana Lange, Patrícia Lopez, Renata Gomes, Rodrigo Schuh, Shenia Pedro Bom, Thabata pela ótima convivência.

À professora Lygia Vitória Galli Terasawa pelo acompanhamento e incentivo em todo o desenvolvimento do trabalho.

À professora Chirlei Glienke por ajudar a fazer o LabGeM funcionar e pela convivência.

As minhas amigas Larice, Marcela e Thais pela amizade e boas conversas.

À dona Izolde Gaertner que sempre foi muito prestativa tornando o trabalho no laboratório menos complicado.

Ao Dr. Francisco Terasawa Júnior pela oportunidade de utilização de genótipos de milho, parentais e híbridos desenvolvidos pela Empresa “Semília Genética e Melhoramento LTDA.”

À Empresa “Semília Genética e Melhoramento LTDA.” pela disponibilidade de materiais e pessoal para o cultivo do milho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná e aos professores do Departamento de Genética pela oportunidade e ensinamentos.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pelo apoio e disponibilidade no desenvolvimento do trabalho.

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

*“POSSO TODAS AS COISAS NAQUELE QUE ME
FORTALECE”*

FILIPENSES 4:13

RESUMO

Fungos denominados dematiáceos causam a helmintosporiose ou manchas em diversas famílias de plantas, tendo uma grande importância para a cultura do milho. Os fungos dematiáceos do gênero *Curvularia* são encontrados com grande frequência em diferentes substratos vegetais, como saprofíticos, fitopatogênicos ou endofíticos, podendo ainda ser isolados a partir do solo e do ar. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial de plantas saudáveis de milho servirem como depositárias de espécies fúngicas patogênicas, especialmente a *Curvularia*, que é associada a diversas doenças em animais e vegetais. Foram isolados fungos de diferentes genótipos de milho, quatro parentais e três híbridos descendentes de cruzamentos destes parentais, da região de Campo Largo, PR. Também foram utilizados 22 isolados de *Curvularia* de Palotina, PR e dois isolados de Curitiba. Foram obtidos 23 isolados de *Curvularia* de três genótipos parentais: G4, G5 e G6, sendo o G5 o que forneceu o maior número de isolados (52%) e dos três genótipos híbridos (G1, G2 e G3). Do parental G7 não foi isolado *Curvularia*. Do híbrido G3 (G4 x G7) foi obtido apenas um isolado. Esses resultados sugerem uma colonização diferenciada para os genótipos de milho testados. A partir da caracterização morfológica foram realizados testes de Scott-Knott para agrupamento em relação ao tamanho dos conídios e crescimento micelial. Pelo comprimento do conídio foram obtidos quatro agrupamentos nos quais, os isolados de Palotina e Campo Largo estão distribuídos. Os isolados de Curitiba permaneceram no mesmo grupo. Pelo tamanho da colônia os agrupamentos foram diferentes aos 5°, 6° e 7° dias e houve uma distribuição heterogênea dos isolados. Características morfológicas foram utilizadas para compor uma matriz de dados e a árvore gerada agrupou os isolados de diferentes origens nos mesmos ramos, porém alguns com baixa sustentabilidade estatística. Foi realizado o sequenciamento das regiões ITS-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico de 37 isolados. As sequências obtidas foram submetidas ao BLAST e analisadas pelos métodos de distância (Neighbor-Joining) e de Parcimônia. Pelo BLAST foi possível averiguar a identidade genética de todos os isolados de Palotina com o *Cochiobolus* sp. Dezesesseis isolados de Campo Largo apresentaram identidade genética acima de 90% com *Cochiobolus lunatus*, teleomorfo *C. lunatus*, espécie patogênica ao homem e animais, e dois com o fitopatógeno *Curvularia trifolli*, com menor identidade. Pela árvore de distância, os isolados de Palotina apresentaram menor variabilidade e ficaram distantes do grupo de Campo Largo que agrupou com uma sequência referência de *Curvularia trifolli*. Próximo a este grupo ainda ficaram *C. gudauskasii* e *C. lunatus*. Na árvore gerada pelo método de Parcimônia, a separação dos grupos de Campo Largo e de Palotina manteve-se. Outros ramos sofreram modificações. Foi possível verificar que por caracterização morfológica os grupos de Campo Largo e Palotina não se separaram enquanto pelos dados do sequenciamento pode-se afirmar com segurança que estes pertencem a diferentes espécies. Cinco isolados foram selecionados para um ensaio de antagonismo contra três espécies de fungos fitopatogênicos: *Guignardia citricarpa*, *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. Todos os isolados testados apresentaram resultados significativos com as espécies ensaiadas, denotando o potencial uso no controle biológico de fitopatógenos deste fungo.

Palavras – Chave: *Zea mays*, fungos dematiáceos, *Curvularia*, caracterização morfológica, caracterização molecular.

ABSTRACT

Dematiaceous fungi cause helminthosporiosis or spots in several plant families and are very important to maize culture. Dematiaceous fungi from the genus *Curvularia* are frequently found in several plant substrates as saprophytic, phytopathogenic or endophytic, and can even be isolated from both soil and air. This present work aimed to assess the potential of healthy maize plaants to serve as a depository of pathogenic fungal species, especially from the *Curvularia* genus, which is associated with several diseases in animals and plants. Fungi from different maize genotypes were isolated – 4 parental strains and 3 hybrids that descend from their cross, from the Campo Largo region, in Paraná (PR) state. Also, 22 *Curvularia* isolates from Palotina, PR, and 2 isolates from Curitiba, PR, were used. 23 *Curvularia* isolates were obtained from 3 parental genotypes - G4, G5 and G6, and G5 provided 52% of all isolates, and also from the 3 hybrids (G1, G2 and G3). No *Curvularia* was isolated from parental strain G7. From the hybrid G3 (G4 x G7), only one isolate was obtained. These results suggest a differentiated colonization for the tested maize genotypes. Scott-Knott tests were performed after a morphological characterization to group individuals regarding conidia size and mycelia growth was performed. By conidia length, four groups were formed in which isolates from Palotina and Campo Largo are distributed. All isolates from Curitiba remained in the same group. By colony size, grouping was different on the 5th, 6th and 7th days and there was a heterogeneous distribution of the isolates. Morphologic characteristics were used to put together a data matrix and the generated tree grouped isolates from different origins in the same branches, although some with low statistical sustainability. ITS-5,8S-ITS2 regions of the ribosomal DNA from 37 isolates were sequenced. Obtained sequences were submitted to BLAST and analyzed by distance (Neighbor-Joining) and parsimony methods. It was possible to assess the genetic identity of all isolates from Palotina to *Cochliobolus* sp, using BLAST. Sixteen isolates from Campo Largo presented more than 90% of their genetic identity with *Cochliobolus lunatus*, teleomorph *C. lunata*, a species pathogenic to men and animals, and 2 isolates with the phytopathogenic *Curvularia trifolli*, with a lower identity. By the distance tree, isolates from Palotina presented lesser variability and were distant from the Campo Largo group which grouped with a reference sequence from *Curvularia trifolli*. Near this group were *C. gudauskasii* and *C. lunatus*. On the tree generated by the parsimony method, the Campo Largo and Palotina groups were kept separated. Other branches underwent modifications. It was possible to verify that by morphologic characterization the groups of Campo Largo and Palotina were not separated while using sequencing data, and it's possible to assure that they belong to different species. Five isolates were selected to undergo an antagonism assay against three species of phytopathogenic fungi: *Guignardia citricarpa*, *Fusarium* sp. and *Trichoderma* sp. All tested isolates showed significant results with the species assayed, denoting their potential use on the biological control of phytopathogens of this fungus.

Keywords: *Zea mays*, dematiaceous fungi, *Curvularia*, morphologic characterization, molecular characterization

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SINTOMAS TÍPICOS DA MANCHA FOLIAR POR <i>Curvularia</i> sp. EM MILHO (<i>Zea mays</i>)	27
FIGURA 2 - LESÕES PROVOCADAS POR <i>Curvularia lunata</i> SOBRE FOLHAS DA JURUBEBA. (A) - LESÕES NA FASE INICIAL DO DESENVOLVIMENTO. (B) - LESÕES MAIS DESENVOLVIDAS CONFERINDO À FOLHA UM ASPECTO DE CRESTAMENTO....	26
FIGURA 3 - REGIÃO DO DNA RIBOSSOMAL COM O ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO ITS1 E ITS2.....	33
FIGURA 4 - ASPECTO DO PLANTIO (DOS MILHOS) NA EMPRESA “SEMÍLIA GENÉTICA E MELHORAMENTO LTDA”, LOCALIZADA NA REGIÃO DE BATEIAS, CAMPO LARGO, PR.....	43
FIGURA 5 - REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL.....	49
FIGURA 6 - ASPECTOS DO CONÍDIO.....	58
FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE <i>Curvularia</i>	59
FIGURA 8 - ÁRVORE GERADA PELO SOFTWARE PAUP SEGUINDO O MÉTODO DA PARCIMÔNIA A PARTIR DOS DADOS OBTIDOS QUANTO A FORMA DOS BORDOS, ASPECTO, COLORAÇÃO DA COLÔNIA E ESPORULAÇÃO DE <i>Curvularia</i> spp.....	75
FIGURA 9 - ÁRVORE DE DISTÂNCIA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS-5,8S-ITS2 DO rDNA PELO MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING.....	79
FIGURA 10 - ÁRVORE GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS-5,8S-ITS2 DO rDNA PELO MÉTODO DE PARCIMÔNIA.....	82
FIGURA 11- DISPOSIÇÃO DAS HIFAS NO TESTE DE ANTAGONISMO DAS LINHAGENS DE <i>Curvularia</i> sp. CONTRA FITOPATÓGENOS.....	86

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - LINHAGENS DE MILHO UTILIZADAS NO ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	36
QUADRO 2 - ISOLADOS DE <i>Curvularia</i> spp. OBTIDOS DE PLANTAS DE MILHO, UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO.....	38
QUADRO 3 - SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E NO SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA.....	48
QUADRO 4 - ISOLADOS OBTIDOS NO <i>GENBANK</i> (COM RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO) PARA COMPARAÇÃO COM AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO PRESENTE ESTUDO.....	54
QUADRO 5 - ISOLADOS DE <i>Curvularia</i> spp. OBTIDOS A PARTIR DOS GENÓTIPOS HÍBRIDOS (G1, G2 E G3) E PARENTAIS (G4, G5, G6 E G7) DE <i>Zea mays</i>	55
QUADRO 6 - IDENTIDADE DOS ISOLADOS POR MORFOLOGIA E POR COMPARAÇÃO COM SEQUÊNCIAS DE REGIÃO ITS DEPOSITADAS NO <i>GENBANK</i>	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ISOLADOS DE <i>Curvularia</i> sp. AGRUPADOS DE ACORDO COM O TAMANHO DO CONÍDIO.....	72
TABELA 2 - ISOLADOS AGRUPADOS POR CRESCIMENTO MICELIAL.....	73
TABELA 3 - TESTE DE ANTAGONISMO DE <i>CURVULARIA</i> SP. CONTRA, <i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>G. citricarpa</i> 33/05 E PC 13/96 EM COMPARAÇÃO AO CRESCIMENTO CONTROLE DE <i>Curvularia</i> SP.....	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 PLANTA HOSPEDEIRA – <i>Zea mays</i>	16
2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	17
2.3 FUNGOS DEMATIÁCEOS	23
2.3.1 O Gênero <i>Curvularia</i>	26
2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA E TAXONOMIA EM FUNGOS.....	29
2.5 ANTAGONISMO ENTRE MICROORGANISMOS.....	33
3 METODOLOGIA	36
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	36
3.2 PREPARO DO MATERIAL.....	39
3.3 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	39
3.3.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)	39
3.3.2 Meio Completo (MC)	40
3.3.3 Lactofenol Azul de Algodão.....	41
3.3.4 Solução de Vitaminas.....	41
3.3.5 GelRed™ (Biotium, Estados Unidos).....	42
3.3.6 Marcador de Peso Molecular (DNA de fago lambda clivado com <i>HindIII</i> Gibco).....	42
3.3.7 Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder 100pb Ludwig Biotec)	42
3.4 CAMPO	43
3.5 EXPERIMENTO A CAMPO.....	43
3.6 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	44
3.7 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	45
3.8 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DOS ISOLADOS	45
3.8.1 Caracterização Morfológica.....	45
3.8.2 Caracterização Molecular por Sequenciamento de Região ITS	47
3.8.2.1 Extração do DNA (RAEDER; BRODA, 1985; modificado por BLANCO,1999)	47
3.8.2.2 Sequenciamento das Regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA	48
3.8.2.3 Purificação do DNA	439

3.8.2.4 Reação de Sequenciamento	50
3.8.2.5 Purificação da Reação de Sequenciamento.....	50
3.8.2.6 Edição e Análise das Sequências	51
3.8.2.7 Análise Filogenética	52
3.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS.....	54
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	57
4.2.1 Caracterização Morfológica.....	57
4.2.2 Caracterização Molecular.....	76
4.3 ANTAGONISMO	83
5. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICES.....	96
ANEXOS.....	116

1 INTRODUÇÃO

O milho constitui uma cultura de grande importância no Brasil e em alguns países da América Central e América do Norte. Sendo o cereal de maior importância no planeta depois do trigo (FAO, 2009). Sua principal utilização é na composição das rações de aves e suínos, totalizando 70% da sua destinação no Brasil. Ainda é utilizado na alimentação humana, especialmente em regiões de baixa renda como o Nordeste do Brasil e em alguns estados do México, onde representa o maior consumo calórico das populações. No Brasil, o Estado do Paraná destaca-se na produção deste cereal. Segundo a Embrapa (2009), associado ao consumo animal e humano, o milho passou a ser o cereal mais plantado no mundo.

Estudos descrevem uma ampla gama de doenças afetando a cultura do milho no Brasil. Autores consideram que houve um aumento significativo na ocorrência e na severidade das doenças nos plantios de milho no país. A este fato é atribuída uma soma de fatores, entre eles: a infestação da planta por microrganismos, como os fungos dematiáceos.

São chamados dematiáceos, os fungos que têm por característica hifas e conídios de coloração escura. Nos vegetais, há inúmeros exemplos de patologias provocadas por estes fungos, como a helmintosporiose ou manchas em diversas famílias de plantas, tendo uma grande importância em culturas como o trigo, milho, arroz, sorgo, cevada, aveia e centeio. Ao mesmo tempo, foi verificado que, em certos casos, pode haver o crescimento fúngico em harmonia com o desenvolvimento da planta.

Os fungos dematiáceos são patógenos oportunistas a humanos ou animais, de baixa patogenicidade, entretanto, o número de doenças a eles relacionado tem aumentado bastante. Em 2001, Herraéz, Rees e Dunstan descreveram uma feoifomicose invasiva, causada por uma espécie de *Curvularia* em um cão da raça Boxer. Já em 2004, Carter e Boudreaux descreveram um caso de uma mulher vítima também de uma feoifomicose cerebral causada pela *Curvularia lunata*, muito encontrada em humanos.

Outros fungos dematiáceos são causadores de lesões em humanos como é o caso da *Fonsecaea pedrosoi*. Esta acomete principalmente lavradores devido ao seu

contato frequente com o solo. Este tipo de lesão tem distribuição mundial (CALIGIORNE *et al.*, 1999).

O gênero *Curvularia* é composto por mais de 40 espécies que se distinguem por diferenças muitas vezes evidentes na morfologia dos conídios, número de septos e morfologia da colônia (SIVANESAN, 1987; HOSOKAWA *et al.*, 2003; SIVANESAN *et al.*, 2003; ZHANG-MENG; ZHANG, 2003; ZHANG-MENG *et al.*, 2004).

O gênero *Curvularia* tem características bem evidentes o que torna sua identificação por meio de características morfológicas relativamente simples (LIMA; FURTADO, 2007). Contudo, a identificação ao nível de espécie é dificultada pelas poucas descrições e ausência de ilustrações em trabalhos mais antigos, bem como pela diversidade de características morfológicas e biométricas dos conídios, causada por diferentes condições de cultura e sobreposição dos valores das medidas apresentadas por diferentes autores (TSUDA; UYAMA, 1982; HOSOKAWA *et al.*, 2003).

Esta situação não impede que a identificação das espécies continue a ser feita numa aproximação fenotípica, com base em características morfológicas e moleculares. Deste modo, a identificação molecular é um diferencial para o reconhecimento das linhagens. Trabalhos de sequenciamento de regiões específicas, codificadoras ou não, do genoma de fungos tem auxiliado significativamente a classificação destes organismos. O sequenciamento do DNA ribossomal tem contribuído para a identificação de várias espécies fúngicas e neste trabalho será utilizado como mais uma ferramenta para a identificação em nível de espécie do gênero *Curvularia*.

A identificação de isolados de *Curvularia* sp. ao nível de espécie é de grande relevância, uma vez que possibilita a detecção de potenciais patógenos humanos e vegetais em culturas importantes no Brasil.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial de plantas saudáveis de milho servirem como depositárias de espécies fúngicas potencialmente patogênicas, especialmente *Curvularia*, que é associada a diversas doenças em animais e vegetais.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos dematiáceos de três linhagens parentais e quatro linhagens híbridas de milho (*Zea mays*) plantadas em Campo Largo, PR;
- Selecionar e caracterizar morfológicamente os fungos dematiáceos do gênero *Curvularia*;
- Comparar os isolados obtidos neste trabalho com outra amostra populacional de *Curvularia* sp. proveniente de milhos em Palotina, PR;
- Avaliar a distribuição dos isolados de *Curvularia* nos diferentes genótipos, parentais ou híbridos, de milho;
- Identificar os isolados de *Curvularia* em nível de espécie por sequenciamento de região ITS;
- Comparar as sequências ITS obtidas com sequências depositadas no *Genbank* para este gênero, enquadrando filogeneticamente os isolados utilizados neste trabalho.
- Verificar se os isolados identificados como *Curvularia* pertencem a espécies descritas como patogênicas a animais ou plantas;
- Avaliar o potencial antagonista de isolados de *Curvularia* em ensaios de atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos: *Guignardia citricarpa*, *Trichoderma* sp e *Fusarium* sp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTA HOSPEDEIRA – *Zea mays*

O milho é um conhecido cereal cultivado em grande parte do mundo. É extensivamente utilizado como alimento humano ou ração animal, devido as suas qualidades nutricionais, pois contém quase todos os aminoácidos conhecidos. Existem várias espécies e variedades de milho pertencentes ao gênero *Zea* (POHL, 2007).

A história do milho é um dos tópicos mais debatidos na arqueologia do Novo Mundo. Estudos moleculares e genéticos indicam que a domesticação do milho aconteceu no sudoeste tropical do México. Apesar de que provas arqueológicas para a evolução do ancestral selvagem do milho, o teosinte, ainda não foram encontradas naquela região pouco estudada, outra pesquisa combinando paleoecologia e arqueologia está documentando a natureza e o tempo da domesticação e dispersão do milho (POHL, 2007).

O teosinte só passou a ser reconhecido como espécie conhecida entre os europeus em 1832, por meio de um botânico alemão chamado Schrader, que denominou aquela planta de ciclo anual com o nome científico *Euchlaena mexicana*.

Evidências levam a crer que seja uma planta de origem americana, visto que era cultivada neste local desde o período pré-colombiano. Os primeiros registros do cultivo do milho datam de 7.300 anos e foram encontrados em pequenas ilhas próximas ao litoral do México. Seu nome, de origem indígena caribenha, significa "sustento da vida". Alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos, Maias, Astecas e Incas reverenciavam o cereal na arte e religião. Grande parte de suas atividades diárias eram ligadas ao seu cultivo (POHL, 2007). Associado ao consumo animal e humano, o milho passou a ser o cereal mais plantado no mundo.

O milho é o segundo cereal em importância no planeta, após o trigo e seguido pelo arroz (FAO, 2009). A safra de verão 2009 - 2010 do Paraná caminha para atingir as melhores expectativas, com alta produtividade esperada para o milho,

considerando as boas condições das lavouras registradas até o momento após chuvas abundantes (Organização das Cooperativas do Paraná). Na realidade, pode-se pensar nos frangos e suínos como um "subproduto" do milho, dada a importância deste cereal na alimentação destes animais (BRUNELLI, 2004). Muito embora o milho seja versátil em seu uso, a produção de milho tem acompanhado o crescimento da produção de suínos e aves, no Brasil e no mundo.

Segundo a EMBRAPA, a produção de milho no Brasil, juntamente com a soja, contribui com cerca de 80% da produção de grãos no Brasil. A diferença entre as duas culturas está no fato que a soja tem liquidez imediata, dada as suas características de "commodity" no mercado internacional, enquanto que milho tem sua produção voltada para abastecimento interno. Apesar disso, o milho tem crescido como cultura comercial apresentando, nos últimos vinte e oito anos, taxas de crescimento da produção de 3,0% ao ano e da área cultivada de 0,4% ao ano.

A produção de milho, no Brasil, caracteriza-se pela divisão da produção em duas épocas de plantio. O plantio de verão, ou primeira safra, é realizado na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fim de agosto, na região Sul, e até os meses de outubro e novembro, no Sudeste e Centro-Oeste. Há também a produção obtida na safrinha, ou segunda safra. A safrinha refere-se ao milho plantado em fevereiro ou março, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Tem se verificado nas últimas safras, um decréscimo na área plantada no período da primeira safra, mas que tem sido compensado pelo aumento dos plantios na safrinha e no aumento do rendimento (DUARTE, 2007).

A produção do milho na primeira safra deverá somar 32,8 milhões de toneladas em 2010, com queda de 3,2% ante a safra anterior, "refletindo a retração na área total plantada (-10,2%)", segundo o IBGE. Os técnicos do instituto comentam no documento de divulgação da pesquisa, que "permanece um quadro desfavorável para o milho, decorrente das baixas cotações no mercado, haja vista o volume estocado". A produtividade média da safrinha foi superior à safra passada devido às boas condições climáticas ocorridas em todo o ciclo da lavoura e pelo maior uso de tecnologia, principalmente em relação ao combate a pragas.

Pereira (1997) descreveu uma ampla gama de doenças afetando a cultura do milho no Brasil. Oliveira *et al.* (2004) apresentaram uma revisão sobre o tema. Estes autores consideraram o significativo aumento na ocorrência e na severidade das

doenças nos plantios de milho no país. A este fato foi atribuída uma soma de fatores, entre eles: modificações no sistema de cultivo; amplitude de semeadura do milho, incluindo-se a “safrinha” e expansão da cultura à região centro-oeste. Isto pode ser confirmado também no Estado do Paraná, onde são encontradas grande diversidade climática e diferentes épocas de semeadura. Contribuíram o cultivo em sistema de plantio direto na palha, sem a destruição de restos culturais e expansão da “safrinha” (TERESAWA JUNIOR, 2006).

Mais de uma centena de espécies de insetos e de outros animais podem desenvolver-se e atingir o nível de praga em milho. A identificação e o conhecimento de seus ciclos biológicos, seus hábitos alimentares e de fatores de controle natural constituem a base das estratégias de manejo econômico e ecológico da fauna.

No Brasil, a *Spodoptera frugiperda* (Smith), conhecida como lagarta-do cartucho, é uma praga importante da cultura do milho e de outras culturas anuais (CRUZ, 1996), podendo ocorrer em todos os estádios de crescimento da cultura. As perdas ocasionadas por pragas à cultura do milho são geralmente indiretas e variam com o estágio de desenvolvimento e do tipo de milho (CARVALHO, 1970; CRUZ *et al.*, 1996; 1999).

2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

O termo endófito foi utilizado inicialmente por Bary em 1866, e foi aplicado à flora microbiana interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações antagonísticas ou simbióticas. Carroll (1988), por sua vez, restringiu o uso do termo endofítico somente para organismos que causam colonizações assintomáticas no hospedeiro, excluindo desta forma os organismos patogênicos e mutualísticos.

Com o aumento de investigações na área e com as descobertas de diferentes aspectos da interação dos fungos com os seus hospedeiros, Petrini (1991) propôs que o termo endófito tivesse uma maior abrangência, de modo a incluir todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

Os fungos endofíticos caracterizam-se por infectar partes aéreas e subterrâneas de plantas sem causar nenhum sintoma aparente ao seu hospedeiro (HERRERO; MÁRQUEZ, 2009).

Não existe uma exata distinção entre as categorias de microrganismos epifíticos, endofíticos e patogênicos. Azevedo (1998) sugere que um microrganismo epifítico pode, eventualmente, ser encontrado dentro de um vegetal como endofítico, em certas condições, e pode até tornar-se um patógeno. Em outras circunstâncias, um patógeno que não afeta o seu hospedeiro pode ser considerado um endófito.

Bultman e Ganey (1995) estudaram a hipótese de que fungos endofíticos vivendo em algumas plantas (gramíneas) parecem aumentar a resistência das plantas hospedeiras a insetos herbívoros. Segundo White Jr. e Cole (1995), em gramíneas (como no caso de *Acremonium* sp. em *Festuca* sp) os endófitos geram uma infecção sistêmica sendo transmitidos de uma geração para outra.

Em alguns casos foram encontradas interações endófito / planta que levam a um melhor desempenho destas (CLAY, 1987), como aumento de área foliar e maior número de ramificações (LATCH; CHRISTENSEN, 1985); maior tolerância ao ataque de insetos (CARROLL; CARROLL, 1978; CLAY, 1987; CARROLL, 1988; AZEVEDO, 2000); resistência a doenças e parasitas (WHITE Jr. COLE, 1985) e antiherbivoria pela produção de toxinas (WHITE Jr.; COLE, 1990).

Potencialmente úteis, os microrganismos endofíticos representam uma fonte de novos compostos químicos e biológicos, podendo ser utilizados não somente para resolver e auxiliar problemas de saúde humana, mas também para plantas e animais. Alguns fungos endofíticos têm sido amplamente estudados devido a sua ação antimicrobiana (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003).

Os endofíticos podem ser utilizados como fontes de metabólitos primários (STAMFORD *et al.*, 1998) e secundários, como o taxol, uma droga quimioterapêutica usada no tratamento de câncer de mama e ovário (WANG *et al.*, 2000 e STROBEL *et al.*, 2000; 2003). O ácido coletótrico, um metabólico do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da *Artemisia mongólica*, apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e contra o fungo patogênico *Helminthosporium sativum* (ZOU *et al.*, 2000). Lu *et al.* (2000) identificaram três novos metabólitos do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. isolado de *Artemisia annua* com propriedades antimicrobianas.

Os microrganismos endofíticos encontrados nos vegetais são fungos e bactérias. Muitos fungos são capazes de produzir metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos (LI *et al.*, 2001; LI e STROBEL, 2001; ZOU e TAN, 2001), anti-helmínticos e inseticidas (AZEVEDO *et al.*, 2000; ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004), apresentando grande potencial que pode ser explorado na agricultura (ZOU e TAN, 2001).

Estudos recentes mostram o potencial de microrganismos endofíticos como antagonistas a microrganismos patogênicos. Figueiredo (2006) isolou de *Maytenus ilicifolia* fungos endofíticos e os avaliou quanto ao potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas a humanos e o fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta do Citros. Os extratos metanólicos de dois isolados exibiram ação fungistática na germinação e no crescimento micelial de *G. citricarpa*. Dois extratos de *Pestalotiopsis* sp. inibiram o crescimento dos microrganismos-teste (*S. aureus* oxalino resistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). Figueiredo *et al.* (2007) descrevem uma alta variabilidade genética entre as espécies de *Pestalotiopsis* sugerindo que esforços para isolamento de novos endófitos provenientes de *M. ilicifolia* devem ser realizados com o objetivo de bioprospecção, dado o potencial biotecnológico de seus metabólitos secundários.

Schulz *et al.* (2002) isolaram, em doze anos de estudos, mais de seis mil e quinhentos fungos endofíticos de árvores e herbáceas, na busca de novos metabólitos com potencial industrial e sugerem que a associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros conduza à produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e anti-herbicida.

No milho foi observado que, em plântulas provenientes de sementes inoculadas com uma linhagem endofítica de *Fusarium moniliforme*, ocorreu maior deposição de lignina nas raízes, sugerindo que esta característica confere maior resistência contra patógenos (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2004).

O fungo endofítico *Muscudor vitigenus* isolado do cipó *Paullinia paullinioides* na Amazônia do Peru, produz naftaleno, que atua como um repelente de insetos (DAISY *et al.*, 2002 a; b).

A presença de fungos endofíticos na árvore tropical *Theobroma cacao* (Malvaceae) no Panamá, confere defesa da planta contra um dos seus maiores patógenos, *Phytophthora* sp. (ARNOLD *et al.*, 2003).

Alguns produtos como a criptocandina, lipopeptídeo antimicótico (STROBEL *et al.*, 2000), além de outros antibióticos, antidiabéticos e compostos imunossupressores isolados de fungos endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003), sugerem sua importância para a indústria farmacêutica.

O fungo endofítico de gramíneas *Neotyphodium* sp. apresenta metabólitos ativos como a ergopeptina e ergovalina, que atuam no sistema nervoso central elevando a temperatura corpórea, provocando vasoconstrição e reduzindo os níveis de prolactina nos animais. As neurotoxinas Lolitrem A e B causam dificuldade na movimentação dos animais que se alimentam da gramínea. A peramina, pirrolizidina e a pirrolopirazina atuam como inseticida, tornando a planta menos atrativa para os insetos. *Neotyphodium* aumentou a tolerância à seca para seu hospedeiro *Festuca aerundinacea*, o crescimento da raiz, a produção de sementes, germinação, captação de fósforo e resistência a nematóides e insetos (SAIKKONEM *et al.*, 1998; PANACCIONE *et al.*, 2001).

A ocorrência de microrganismos endofíticos nos vegetais resulta da penetração através de feridas ocasionadas nas raízes pela abrasão destas com o solo, aberturas naturais, como hidatódios e estômatos, aberturas artificiais sofridas pela ação de pragas, animais, o homem ou agressões abióticas. A penetração pode ocorrer por meio de conídios levados pelo vento ou hifas que invadem os tecidos. Muitos endófitos produzem massas de conídios delgados, característica associada com a dispersão por chuvas (RIBEIRO, 1995). Outra forma de propagação se dá pela transmissão vertical por meio de sementes (WHITE JR *et al.*, 1995; CLAY, 2004; ESPÓSITO; AZEVEDO, 2004).

A partir do isolamento, eles podem ser observados por diferentes métodos, sendo que a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitou a Strobel e colaboradores (2000 b) detectar acérvulos de *Pestalotiopsis microspora* e estruturas sexuadas de *P. hansenii*, ambos os fungos endofíticos produtores de taxol.

Partindo da técnica de microcultivo, Pimentel (2001), observou, com o auxílio microscopia eletrônica de varredura, conídios, conidióforos e fiáides dos fungos endofíticos entomopatogênicos *Beauveria* sp. isolados do milho e *Paecilomyces* sp. isolados do milho e da soja.

Glienke-Blanco *et al.* (2002), investigando a variabilidade do endofítico *G. citricarpa* de citros, observaram picnidiosporos, conidióforos, ascos jovens, ascósporos, hifas e outras estruturas usando microscopia ótica.

Existe uma diversidade enorme de microrganismos endofíticos presentes no interior de plantas saudáveis com grande potencial para serem estudados. Dreyffus e Chapela (1994) estimam que ocorra, no mínimo, um milhão de espécies de fungos endofíticos. No Brasil, exemplos desta diversidade podem ser encontrados nos trabalhos de Pereira (1993); Pereira, Azevedo e Petrini (1993); Glienke (1995); Souza (1996); Araújo (1996); Rodrigues e Dias-Filho (1996); Azevedo (1998); Maitan (1998); Araújo *et al.* (2000); Penna (2000); Pimentel *et al.* (2001a); Pimentel *et al.* (2001b); Souza, Astolfi e Pereira (2001); Souza *et al.* (2004); Rubini *et al.* (2005); Almeida, Yara e Almeida (2005).

A composição das espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação. Uma ou duas espécies são predominantes como endofíticas em um dado hospedeiro, enquanto outros isolados são pouco frequentes (CARROLL e CARROLL, 1978; ARNOLD, 2003).

Ernest, Mendgen e Wirsal (2003) investigaram a interação entre o fungo endofítico *Stagonospora* spp. e *Pharagmites australis* e evidenciaram que a colonização do hospedeiro ocorre de forma diferenciada no decorrer do ano. Na primavera o endófito foi encontrado somente na raiz, enquanto no outono ele é encontrado em todo o vegetal.

Tanto a planta hospedeira como as regiões onde os endofíticos são isolados podem influenciar a produção de metabólitos secundários. De acordo com dados estatísticos, Bills *et al.* (2002) compararam a produção de metabólitos de endofíticos provenientes de regiões tropicais e de regiões temperadas. Pela análise dos dados, os autores verificaram que regiões tropicais são mais ricas na produção tanto de endófitos como dos metabólitos secundários.

2.3 FUNGOS DEMATIÁCEOS

Fungos dematiáceos constituem um grupo grande e heterogêneo, cuja principal característica é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas (AL-DOORY, 1983; BAYLES, 1989; DIXON; POLAKWISS, 1991). Estes fungos estão amplamente distribuídos entre os filos Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (HOOG; HAASE, 1999). São chamados de dematiáceos ou demáceos, pois têm por característica hifas e conídios de coloração escura, devido à presença de melanina em sua parede celular.

A melanina destes fungos é formada pelo polímero Diidroxinaftaleno (DNH), que é produzido no citoplasma e excretado na parede celular (POLAK, 1990). Este polímero faz interações com lipídeos, proteínas e carboidratos da parede, formando o complexo melanínico. Este complexo é um importante fator de virulência dos fungos negros, onde a sua porção lipídica está relacionada à indução do granuloma nos tecidos do hospedeiro, enquanto a porção peptídica tem a função de quelar cátions, competindo com proteínas do soro. A porção de carboidratos tem um papel importante na interação célula-célula, facilitando a interação do agente com os tecidos do hospedeiro (ALVIANO *et al.*, 1991). Existem alguns trabalhos que têm demonstrado que a melanina tem função antioxidante, neutralizando os efeitos da descarga oxidativa dos neutrófilos nos tecidos do hospedeiro e também permitindo que o fungo resista a maiores concentrações de permanganato e hipoclorito (SCHNITZLER *et al.*, 1999; JACOBSON *et al.*, 1995).

Além de pigmentos carotenóides e da melanina, que são prováveis responsáveis pela proteção contra alguns estresses, a parede celular pode conter proteínas, glicoproteínas e carboidratos, entre outros componentes (GEIS; SZANISZLO, 1984; TAYLOR *et al.*, 1987; POLAK, 1990; DIXON *et al.*, 1991).

Lipídeos de superfície e proteínas influenciam na fixação dos fungos nas células a serem invadidas. Souza *et al.* (1986) estudaram a interação de resíduos de manose e de *N*-acetilglucosamina no processo de conexão e invasão de *Fonsecaea pedrosoi*. Em células de *F. pedrosoi* foram detectados polissacarídeos compostos de glucose, manose galactofuranose, ramnose e glucosamina; e os seguintes ácidos

graxos: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico e ácido aracdônico (ALVIANO *et al.*, 1995).

A família Herpotrichiellaceae reúne a maioria dos fungos dematiáceos, os quais são responsáveis por uma diversidade de micoses em humanos, tais como: cromoblastomicose, micetomas e feohifomicose. Fungos pertencentes a esta família, como os gêneros *Exophiala* e *Cladophialofora*, são conhecidos agentes causadores de infecções com manifestações clínicas variadas em humanos e animais (HOOG, 1993).

Os fungos dos gêneros *Curvularia* sp. e *Drechslera* sp. são encontrados no solo e em várias regiões do mundo. Os dematiáceos são patógenos oportunistas, humanos ou animais, de baixa patogenicidade, entretanto, o número de doenças a eles relacionado tem aumentado, dentre as quais é possível citar infecções locais, doenças alérgicas, pneumonia, abscessos cerebrais e infecções (REVANKAR, 2007).

Doenças como as ferrugens, os carvões, a requeima da batatinha, as murchas do algodoeiro e do tomateiro, a brusone do arroz, a antracnose do feijoeiro e do sorgo, as helmintosporioses do milho, do sorgo e do trigo são exemplos de micoses em plantas. Os fungos dematiáceos causam a helmintosporiose ou manchas em diversas famílias de plantas, tendo uma grande importância em culturas como o trigo, milho, arroz, sorgo, cevada, aveia e centeio. As espécies dos gêneros *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum* são fungos negros conhecidos entre os agricultores de todo o mundo. Alguns grupos de plantas, como as palmeiras, os cactos, as leguminosas, as gramíneas, as plantas produtoras de látex, o trigo, o milho, o arroz e o café, são afetados por estas espécies (CALIGIORNE *et al.*, 1999).

O desenvolvimento filamentoso é caracterizado por colônias de aspecto escuro (marrom, verde oliva ou negras) onde microscopicamente observam-se hifas com septos escuros. Muitas espécies são sapróbias e de crescimento rápido, enquanto outras não patogênicas desenvolvem-se lentamente em meios de cultura definidos (HOOG e GUARRO, 1995).

Entre os dematiáceos de crescimento rápido alguns grupos são caracterizados por possuírem conídios multicelulares, septados transversal e longitudinalmente (dictioporos), tais como *Alternaria*, *Stemphylium*, *Epicoccum*, *Ulocladium*. Enquanto outros gêneros como *Curvularia* e *Drechslera*, apresentam conídios multicelulares septados apenas transversalmente. Conídios unicelulares

são característicos dos gêneros sapróbios *Cladosporium*, *Nigrospora* e *Aerobasidium* (GUERIM, 2007).

Os dematiáceos de crescimento lento produzem conídios por fiáides com ou sem colaretes em cadeia ou simpodialmente, formando uma pequena família, a Herpotrichiellaceae, a qual reúne especificamente agentes patógenos de humanos pertencentes aos gêneros *Phialophora*, *Ramichloridium*, *Rinocladiella*, *Sarcinomyces*, *Cladophialophora*, *Exophiala* e *Fonsecaea*. (GUERIM, 2007).

Os fungos dematiáceos que durante parte do seu ciclo de vida apresentam desenvolvimento leveduriforme, são denominados de leveduras negras. A primeira descrição deste grupo foi feita por Marpmann em 1986, designada *Saccharomyces niger* Marpmann. Posteriormente, foram descritas leveduras negras de importância industrial nos gêneros *Moniella* e *Trichosporonoides*, filo Basidiomycota. Esses fungos são caracterizados pela fermentação da glicose e outros açúcares, ausência de crescimento na presença de trealose, presença do sistema decoenzima Q-9 ubiquinona, ocorrendo principalmente em substratos ácidos e gordurosos (HOOG, 1979).

Nos vegetais, há inúmeros exemplos de patologias provocadas por estes fungos. Ao mesmo tempo, foi verificado que, em certos casos, pode haver o crescimento fúngico em harmonia com o desenvolvimento da planta, como em *Aegle marmelos correa*, em que houve crescimento de fungos patogênicos, como *Drechslera* e *Curvularia*, em vegetais saudáveis (GOND *et al.*, 2007).

Conídios de *Drechslera monoceras* foram usados como ingrediente ativo de um potencial antifúngico. Em outras espécies também foram comprovadas bioatividades. *Drechslera siccans* produz fitotoxinas como a drazepinona, a qual foi isolada do fungo presente em *Lolium perenne*, e age contra o crescimento das ervas daninhas, podendo ser usado como herbicida natural (EVIDENTE *et al.*, 2005). Outros potenciais herbicidas são as ofiobolinas produzidas por *Drechslera gigantea* (EVIDENTE *et al.*, 2006).

Fungos do gênero *Bipolaris* estão presentes em plantas, nas quais agem como saprófitos. Porém, podem ser patogênicos para certas espécies de plantas, como as gramíneas, e para animais. Em humanos provocam alergias, sinusite, micoses e também infecções pulmonares e cutâneas. *Bipolaris infecta* tanto sistemas imunodeprimidos, quanto saudáveis. (FRYEN, *et al.*, 1999).

2.3.1 O Gênero *Curvularia*

De acordo com Boedijn (1933) (apud SUN *et al.*, 2003), a classificação taxonômica do gênero *Curvularia* é: Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Euascomycetes; Ordem: Pleosporales; Família: Pleosporaceae; Gênero: *Curvularia*.

Dentro de estudos sobre a micoflora de muitos ecossistemas, os fungos do gênero *Curvularia* constituem um dos mais fascinantes grupos, devido à grande frequência com que exemplares são encontrados e ao elevado número de espécies que são normalmente identificadas em diferentes substratos vegetais e no solo, podendo ainda ser isolada a partir do solo e do ar. Apesar da maioria dos espécimes do gênero ser conhecida como saprófita, alguns são fitopatogênicos, sobretudo em gramíneas e em regiões de clima tropical e subtropical (FIGURAS 1 e 2). (SIVANESAN, 1987). A Figura 1 mostra uma folha de milho infectada por *Curvularia* sp. Outro caso de lesão foliar causada por *Curvularia* foi descrito em Jurubeba, nome popular da *Solanum paniculatum* L., como mostra a Figura 2.

Algumas espécies deste gênero podem originar doenças em animais, incluindo humanos, surgindo como agentes de sinusite alérgica, pneumonia, endocardite, feohifomicose; feridas infecciosas, micetoma, onicomicose, queratites, abscessos cerebrais, entre outros (CARTER; BOUDREAUX, 2004).

Fungos deste gênero são filamentosos e geralmente causam doenças em pessoas imunodeprimidas, mas há estudos que mostram casos em que age como patógeno em indivíduos imunocompetentes. *Curvularia lunata*, é a maior causadora de infecções em pacientes sem alterações no sistema imune (CARTER; BOUDREAUX, 2004). Porém, algumas espécies têm sido identificadas como patogênicas a humanos (PIMENTEL, 2005). Um caso descrito na literatura é o de uma paciente de 85 anos que faleceu devido a complicações de uma peritonite associada à *Curvularia* spp.



FIGURA 1 - SINTOMAS TÍPICOS DA MANCHA FOLIAR POR *Curvularia* sp. EM MILHO (*Zea mays*).

FONTE: CIMMYT (2009) (International Maize and Wheat Improvement Center)

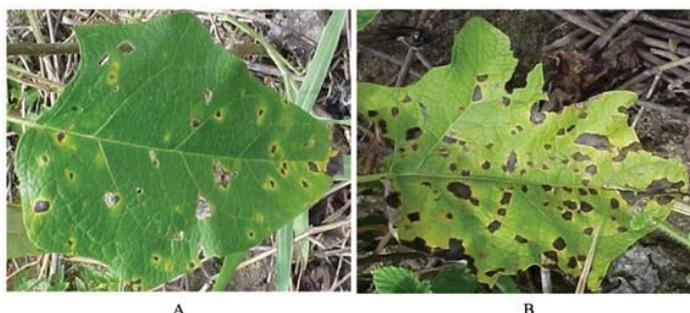


FIGURA 2- LESÕES PROVOCADAS POR *Curvularia lunata* SOBRE FOLHAS DA JURUBEBA. (A) - LESÕES NA FASE INICIAL DO DESENVOLVIMENTO. (B) - LESÕES MAIS DESENVOLVIDAS CONFERINDO À FOLHA UM ASPECTO DE CRESTAMENTO

FONTE: Assunção (2006).

Descrito com a espécie tipo *C. lunata* (Wakker) Boedijn, o gênero *Curvularia* permitiu acomodar espécies da família Dematiaceae que possuíam conidióforos macronematosos, mononematosos, diretos ou flexuosos, frequentemente geniculados, por vezes nodosos, células conidiogênicas politétricas, integradas, terminais e simpodiais, fragmoconídios solitários, acropleurógenos por proliferação subterminal do conidióforo, oliváceos a castanhos, elipsóides, cilíndricos, obovóides ou piriformes, três ou mais septos transversais, terceira célula ou segunda e terceira distintamente maiores e escuras, muitas vezes desigualmente curvos devido ao

alargamento de uma ou duas células centrais, raramente direitos, septos rígidos, hilo truncado ou protuberante (ELLIS, 1971).

Algumas espécies possuem teleomorfo conhecido no gênero *Cochliobolus* Drechsler 1934, formando ascósporos filiformes paralelos ou frouxamente enrolados em espiral, característica não evidenciada pela espécie tipo do gênero, *C. heterostrophus* (Drechsler) Drechsler, teleomorfo de *Bipolaris maydis* (Nisik. & Miyake) Shoem., na qual os ascósporos se mostram enrolados formando uma espiral fechada. Por isso, teleomorfos dos fungos do gênero *Curvularia* são considerados por alguns autores como sendo do gênero *Pseudocochliobolus* Tsuda, Ueyama & Nishih. 1978, que é tido como uma sinonímia de *Cochliobolus* (ALCORN 1983, SIVANESAN 1987).

O gênero é composto por mais de 40 táxons que se distinguem por diferenças muitas vezes evidentes na morfologia dos conídios, número de septos e morfologia da colônia (SIVANESAN, 1987; HOSOKAWA *et al.*, 2003; SIVANESAN *et al.*, 2003; ZHANG-MENG; ZHANG, 2003; ZHANG-MENG *et al.*, 2004; CHUNG, 2005).

Algumas espécies possuem teleomorfo conhecido, como o gênero *Cochliobolus* Drechsler 1934, que forma ascósporos filiformes paralelos ou frouxamente enrolados em espiral. Esta característica não é evidenciada pela espécie tipo do gênero, *C. heterostrophus* (Drechsler), teleomorfo de *Bipolaris maydis* (Nisik. & Miyake) Shoem, na qual os ascósporos se mostram enrolados formando uma espiral fechada. Por isso, teleomorfos dos fungos do gênero *Curvularia* são considerados por alguns autores como sendo do gênero *Pseudocochliobolus* Tsuda, Ueyama & Nishih 1978, que é tido como uma sinonímia de *Cochliobolus* (ALCORN 1983, SIVANESAN 1987). Interessante é que sendo filogeneticamente próximo do gênero *Bipolaris* Shoem. 1959, as espécies apresentam semelhanças morfológicas com espécies do gênero *Bipolaris* que têm conídios pequenos e direitos e estudos com análise de sequências ITS e com o marcador enzimático gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase mostraram que partilham teleomorfo do gênero *Cochliobolus* (BERBEE *et al.* 1999).

A variabilidade morfológica observada nos fungos enquadrados em *Curvularia* fez com que as espécies fossem separadas em três grupos, 'geniculata', com a espécie-tipo *C. geniculata* (Tracy & Earle) Boedijn, 'lunata', com a espécie-tipo *C. lunata* (Tracy & Earle) Boedijn, e 'maculans', com a espécie-tipo *C. maculans*

(Bancroft) Boedijn (= *C. eragrostidis* (Henn.) Mey.), que se diferenciaram pela forma dos conídios e número de septos (CORBETTA 1964). Nos grupos 'lunata' e 'maculans' ficaram as espécies de conídios com 3 septos e no grupo 'geniculata' as espécies que tem conídios com 4 septos ou com maior número de septos. As espécies do grupo 'lunata' distinguiram-se das do grupo 'maculans' principalmente por apresentarem curvatura mais pronunciada, célula mediana mais volumosa e habitual presença de estroma em cultura.

O reconhecimento das principais características do gênero *Curvularia* é relativamente fácil, o que permite que seja normalmente possível a identificação do gênero (LIMA; FURTADO, 2007). No entanto, a identificação em espécie é muitas vezes complicada por descrições vagas e ausência de ilustrações em trabalhos mais antigos, inconstância de características morfológicas e biométricas dos conídios, causadas por diferentes condições em que ocorre o crescimento e sobreposição dos valores das medidas apresentadas por diferentes autores (TSUDA; UEYAMA, 1982; HOSOKAWA *et al.*, 2003). Contudo, esta situação não impede que a identificação das espécies continue a ser feita numa aproximação fenotípica, com base em características morfológicas e com o auxílio de análises genéticas.

Recentemente, as espécies *C. fallax* Boedijn, *C. geniculata* (Tracy & Earle) Boedijn e *C. senegalensis* (Speg.) Subram., do grupo 'geniculata', que eram aceitas como taxons válidos em monografias clássicas do gênero (ELLIS 1971, SIVANESAN 1987) mostraram-se interférteis (HOSOKAWA *et al.*, 2003). Estas passaram a ser consideradas, com base em características morfológicas e análise de DNA total por RFLP (HOSOKAWA *et al.*, 2003) e na análise da sequência do gene *Brn1*, gene participante da via de produção da melanina, (SUN *et al.*, 2003), como espécie única e sinonimizadas com *C. geniculata*.

Curvularia eragrostidis é o causador de uma doença em mudas de chá (*Camellia sinensis*), causando dano extensivo em novas plantações (DASGUPTA; SAHA; SAHA, 2005). *Curvularia senegalensis* é capaz de provocar doenças em espécies vegetais de interesse econômico, como *Bactris gasipaes* (pupunheira) e *Archontophoenix* sp. (palmeira real). *Curvularia eragrostidis* (Henn) Meyer é o causador da queima das folhas do inhame, levando algumas vezes à perda total da produção (MOURA, 2001).

Shan *et al.* (2008) isolaram *Curvularia lunata* de 14 áreas de produção de milho, na Província de Hebei, na China. Os autores encontraram ainda *C. clavata*, *C.*

eragrostidis e *C. intermedia*, todos causando doença em cultivares de milho, embora *C. lunata* e *C. intermedia* fossem mais patogênicos.

Foi verificada atividade antifúngica, antiviral e antioxidante em *Curvularia* extraído de plantas do gênero *Garcinia* na Tailândia, o que indica um possível uso como biocontrole de doenças (PHONGPAICHIT *et al.*,1994).

2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA E TAXONOMIA EM FUNGOS

A análise da variabilidade genética em fungos pode ser feita por meio de técnicas clássicas ou moleculares. As clássicas envolvem a análise dos fenótipos, podendo também ser utilizadas características bioquímicas. As técnicas moleculares permitem a análise ao nível do DNA para diferenciar indivíduos dentro de espécies (ROSEWICH; MCDONALD, 1994). Desta forma, a análise dos ácidos nucleicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de indivíduos e no esclarecimento filogenético dos organismos estudados. Os dados moleculares frequentemente complementam hipóteses baseadas em estudos morfológicos, mas em algumas vezes os resultados obtidos da análise de DNA, são conflitantes com dados obtidos de análises exclusivamente morfológicas. Esta contradição pode ser observada principalmente na classificação taxonômica de microrganismos (SAMUELS; SEIFERT, 1995).

Os fungos, em geral, são muito variáveis, sendo sua taxonomia principalmente feita por meio de características morfológicas e bioquímicas, as quais nem sempre refletem sua real diversidade (FEGAN *et al.*, 1993). A análise ao nível do DNA permite que a variabilidade seja corretamente interpretada e a taxonomia destes organismos em alguns casos torna-se mais fácil e confiável (KHACHATOURIANS, 1995).

A delimitação de espécies de *Phomopsis* baseado apenas em características morfológicas demonstrou-se inadequada (VAN DER AA, 1990). Em adição às características de morfologia do conídio e características da colônia usadas para identificar espécies, alguns autores têm utilizado caracteres alternativos que incluem virulência (VIDIC, 1991), proteínas e sorologia (LEE e SNOW, 1992; VELICHETI *et al.*,1991), sequências ITS (ZHANG *et al.*, 1998) e enzimas e

metabólitos secundários (SHIVAS, ALLEN e WILLIAMSON, 1991). Infelizmente, nenhum caráter foi aplicável para distinguir todos os grupos de isolados (REHNER e UECKER, 1994). O entendimento sobre o gênero expandiu-se por meio de estudos genéticos, nos quais alguns dos isolados agruparam-se por regiões geográficas (REHNER e UECKER, 1994).

Alguns trabalhos têm comparado dados morfológicos com dados moleculares. Zhang *et al.* (1998) distinguiu cinco táxons de *Phomopsis* isolados de Soja (*Glycine max*) utilizando sequências da região ITS do DNA ribossomal, porém não foram capazes de diferenciá-los com base nas características morfológicas.

Farr, Castlebury e Rossman (2002) caracterizaram por análise molecular, com o uso de sequências ITS1, 5,8S, ITS2 e por características morfológicas, linhagens de *Phomopsis* sp. isolados de *Vaccinium corymbosum* e *V. macrocarpon*. Baseados nesse estudo, os autores verificaram que a maioria dos isolados tratava-se de *Phomopsis vaccinii*, uma vez que as sequências agruparam-se com uma cultura referência dessa espécie.

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade em sequências de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Para o estudo de fungos, as técnicas de biologia molecular mais utilizadas são: eletroforese de isoenzimas, RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), análise do DNA mitocondrial, análise do DNA ribossômico muitas vezes através de sequências ITS (“Internal Transcribed Spacer”), eletroforese em campo pulsado, análise do polimorfismo do DNA telomérico, e, ainda, a análise de outras sequências como o gene do Fator de Elongação da tradução, genes da actina, beta-tubulina, entre outras. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo (STRINGARI, 2009).

A análise de isoenzimas permite detectar alelos de genes que originam proteínas como as esterases, amilases, entre outras. Bandas distintas mostram combinações diferentes de aminoácidos nas proteínas. Muito utilizada nos estudos de genética de populações, as isoenzimas constituem uma importante fonte de marcadores genéticos que permitem a análise de vários locos simultaneamente, a identificação de heterozigotos, detecção da variabilidade em um nível próximo do DNA, identificação de culturas fúngicas e determinação da variabilidade natural de

populações (ALFENAS *et al.*, 1991). Apesar de sua relativa simplicidade e eficiência, algumas isoenzimas têm sua produção alterada em virtude de componentes de meios de cultura utilizados para microrganismos (St LEGER *et al.*, 1992), limitando as análises e conseqüentemente, as interpretações dos resultados.

Com a descoberta de que sítios para enzimas de restrição poderiam estar presentes nos organismos em diferentes locais e número, desenvolveu-se a técnica de RFLP. As principais aplicações do RFLP são: o estudo da organização e evolução do genoma fúngico; identificação de genes específicos; estudos de genética de populações; taxonomia e obtenção de mapas genéticos (MICHELMORE e HULBERT, 1987). Uma associação desta técnica com a técnica de PCR, a PCR-RFLP, vem sendo utilizada para a caracterização de diversos organismos, inclusive fungos. Como o DNA no qual serão investigados os sítios de restrição é produto de PCR e os polimorfismos são detectados diretamente em eletroforeses, as desvantagens citadas acima são quase que totalmente superadas. Cohen *et al.* (2003) usou esta técnica para identificar o fungo fitopatogênico *Phytophthora citrophthora*, isolado de citros.

Entre todas as técnicas desenvolvidas para a análise de DNA e RNA, nenhuma teve o impacto da PCR (“Polymerase Chain Reaction”) ou reação em cadeia da polimerase, técnica de um procedimento conceitualmente simples que vem sendo extensivamente utilizada. Desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis, a PCR tornou possível a produção de múltiplas cópias de sequências específicas de DNA, sem a necessidade de clonar estas sequências (ALBERTS *et al.*, 2004). Vários métodos de caracterização de gêneros, espécies, variedades e até mesmo linhagens específicas de fungos vêm utilizando a técnica de PCR.

Tomando os princípios da PCR, dois grupos desenvolveram praticamente ao mesmo tempo a técnica de RAPD ou polimorfismo do DNA amplificado ao acaso. Williams *et al.* (1990) e Welsh e McLelland (1990) passaram a utilizar apenas um oligonucleotídeo iniciador de sequência arbitrária, geralmente com 10 nucleotídeos, que amplifica regiões específicas de cada genoma. Vários estudos têm sido realizados em fungos filamentosos, baseados em marcadores RAPD, como em *Colletotrichum*, em que o uso destes tem sido útil na identificação de raças da espécie *C. graminicola* na antracnose do sorgo (GUTHRIE *et al.*, 1992). Em *Guignardia citricarpa* foram encontradas similaridades entre isolados de várias regiões do Brasil e da Argentina, e foi possível diferenciar os isolados patogênicos e

os endofíticos por meio do padrão de bandas obtido com marcadores de RAPD (GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002).

Shan e colaboradores (2008) analisaram 28 isolados de *Curvularia* sp, endofíticos de milho, por meio de RAPD, obtendo 185 marcadores, dos quais 142 eram polimórficos. O agrupamento baseado nestes marcadores permitiu a separação destes isolados em quatro espécies e ainda evidenciou a grande variabilidade genética intra-espécie de *C. lunata*.

O rDNA consiste em regiões do genoma conservadas separados por regiões variáveis, por isto vem sendo muito utilizado para estudos de identificação de organismos com o objetivo de caracterizar aspectos adicionais dos patógenos que poderiam contribuir para melhor entendimento da sua evolução, bem como para obter um controle mais eficaz do mesmo (WHITE *et al.*, 1990). Uma das técnicas mais utilizada na Micologia é a amplificação de rDNA (DNA ribossômico) por PCR. Esta técnica permite a amplificação de regiões específicas do genoma, como a região espaçadora interna transcrita (ITS), localizado entre regiões altamente conservadas. A região ITS é conservada dentro do táxon de espécie, mas é variável entre espécies, sendo frequentemente usado para taxonomia (BRUNS *et al.*, 1991)

A identificação em nível gênero/espécie de fungos responsáveis por micetomas, como é o caso da *Curvularia lunata*, *Madurella mycetomatis*, *Leptosphaeria* spp., *Exophiala jeanselmei*, *Pyrenochaeta* spp., é dificultada pela sua frequente incapacidade de desenvolver, no meio de cultura, estruturas que possibilitem uma identificação precisa. Uma ferramenta de confiança é, portanto, necessária para identificar as linhagens responsáveis por eumicetoma (micetoma causado por fungos) em nível de espécie. Desnos-Ollivier *et al.* (2006) confirma a utilidade do sequenciamento da região ITS para identificação das espécies e determinação da posição taxonômica destes fungos.

Marcadores localizados na região ITS podem gerar um grande número de informações e determinar uma medida mais precisa das distâncias genéticas entre espécies, facilitando a análise filogenética com inferência na variação taxonômica das espécies (LEE e TAYLOR, 1992).

As técnicas de PCR aliada ao sequenciamento direto, principalmente de DNA ribossomal, tornaram possível a comparação de ITS de muitos isolados e tem permitido avanços significativos na organização taxonômica dos fungos, tendo como

vantagem a determinação da ordem dos nucleotídeos com rapidez e eficácia. (WHITE, 1990; SARTORI, 2005).

O DNA ribossômico, na maioria dos eucariontes apresenta-se como arranjo repetitivo aleatório, dos três genes principais que codificam para os diferentes tipos de rRNA e tem sido utilizado no estudo filogenético de fungos (BRUNS; WHITE; TAYLOR, 1991). As sequências codificantes do rDNA evoluem lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Porém, as regiões espaçadoras internas destes genes conhecidas como ITS, evoluem mais rapidamente, apresentando alto grau de polimorfismo, sendo então, muito útil em estudos filogenéticos em níveis taxonômicos mais baixos, como gêneros e espécies. Na identificação de fungos fitopatogênicos, estas sequências ITS (FIGURA 3) têm servido como mais uma fonte de informação relevante na classificação taxonômica de várias espécies (BAAYEN *et al.*, 2002; BONANTS *et al.*, 2003; PANDEY; REDDY; SURYANARAYANAN, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004; STRINGARI, 2004).

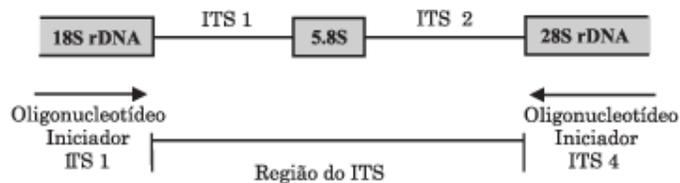


FIGURA 3 - REGIÃO DO DNA RIBOSSOMAL COM O ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO ITS1 E ITS2.

FONTE: White *et al.* (1990)

2.5 ANTAGONISMO ENTRE MICRORGANISMOS

Antagonista é todo agente biológico com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. Desta forma o nicho ecológico ocupado pelos endófitos favorece o controle biológico, pois neste local podem competir por

nutrientes e espaço com os patógenos, bem como produzir substâncias tóxicas a estes organismos ou ainda, induzir a planta a desenvolver resistência às doenças (MELO; AZEVEDO, 1998).

Arnold *et al.* (2003) comprovaram o antagonismo entre fungos endofíticos do cacau (*Theobroma cacao*) e o fitopatógeno *Phytophthora infestans*. Fungos endofíticos foram isolados de árvores de cacau e inoculados em mudas estéreis. Posteriormente, nas mesmas mudas foi inoculado o fitopatógeno. Surpreendentemente, mudas inoculadas com os endófitos tiveram apenas uma pequena ocupação do fitopatógeno em suas folhas, comprovando que a interação entre os microrganismos endofíticos e o hospedeiro, tem efeito negativo sobre o fitopatógeno, resultando na inibição do seu crescimento.

Martins-Corder e Melo (1998) realizaram diferentes testes de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Verticillium dahliae* KLEB, demonstrando ampla capacidade antagonista. Através da secreção de metabólitos tóxicos por *Trichoderma* spp. ocorreu a degradação das hifas hospedeiras, que inibiu o desenvolvimento de *V. dahliae*. Segundo os pesquisadores, os mecanismos de controle biológico podem ocorrer ao longo do processo de vida do antagonista, os quais se sobrepõem e prejudicam a vida dos competidores.

A seleção de antagonistas baseia-se em evidências de que o organismo candidato interfere, de algum modo, no desenvolvimento do patógeno. Esta interferência implica em algumas formas de destruição ou inibição, podendo ser avaliada primeiramente *in vitro* e depois *in vivo*, conforme descreveram Rubini *et al.* (2005). Ainda em relação a *C. pernicioso*, De Marco, Iglis-Valadares e Felix (2003) descrevem a produção de enzimas hidrolíticas produzidas por cepas do gênero *Trichoderma*, importantes no controle deste fitopatógeno.

Barbosa *et al.* (2001) investigaram o antagonismo entre espécies de *Trichoderma* contra *Cladosporium herbarum*, causador de verrugose em frutos de maracujá.

Shalini, Lata e Kotasthane (2006) demonstraram a atuação de isolados de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani*, onde a hifa se enrola em torno do patógeno, penetra, causa a lise e, conseqüentemente, morte do patógeno.

Microrganismos antagonistas podem ser selecionados com base no seu potencial antagonista para uso como agentes de controle biológico de outros microrganismos fitopatogênicos, por exemplo, aqueles que causam doenças em

plantas. Segundo Bettiol (1991), doença é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e diversos não patógenos que habitam o sítio de infecção e que por conseqüência, apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Para o autor, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico.

O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre microrganismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação: antibiose, predação, indução de resistência da planta hospedeira, micoparasitismo, produção de enzimas e toxinas, colonização sistêmica da planta hospedeira, competição de nutrientes e sítios de colonização e liberação de enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da parede celular (BETTIOL, 1991; MELO e AZEVEDO, 1998).

Há relatos na literatura de diversos microrganismos utilizados como agentes no controle de fungos fitopatogênicos, entre eles espécies de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pythium*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, entre outros (MELO e AZEVEDO, 1998).

Os testes de seleção de microrganismos com potencial para o controle biológico podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*, em condições controladas ou em condições naturais. Ambos os métodos são complementares. Os principais métodos de seleção de microrganismos *in vitro* descritos são: pareamento de culturas, papel celofane, placa sobreposta, líquido metabólico, etc. (MARIANO, 1993). A seleção de microrganismo *in vivo* é realizada através da aplicação do antagonista, seguida da inoculação do patógeno no hospedeiro por meio de pulverização de suspensão de células, imersão de raízes, ferimentos, dentre outros (MELO e AZEVEDO, 1998).

Após o isolamento e seleção de um antagonista, o emprego de microrganismo como agente de controle biológico de fitopatógenos, ocorre principalmente por meio do tratamento das sementes, do solo, das partes aéreas das plantas e pós-colheita.

3 METODOLOGIA

Este projeto de pesquisa foi realizado parcialmente na Empresa “Semília Genética e Melhoramento LTDA.”, localizada na região de Bateias, município de Campo Largo, no estado do Paraná, onde foram plantados 7 diferentes genótipos de milho, conforme apresentado no Quadro 1. O isolamento dos microrganismos endofíticos e os outros experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) e na Unidade de Sequenciamento e Análise de DNA (SEAD) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O isolamento dos fungos negros endofíticos foi feito a partir de sete linhagens de milho (*Zea mays*). Destas sete linhagens, três são genótipos parentais e quatro são híbridos resultantes dos cruzamentos destes parentais. Estas linhagens pertencem à Empresa “Semília Genética e Melhoramento LTDA.” e foram gentilmente cedidas para o presente estudo (QUADRO 1).

GENÓTIPOS	TIPO
G1	HÍBRIDO (LA x LC)
G2	HÍBRIDO (LA x LB)
G3	HÍBRIDO (LA x LD)
G4	PARENTAL (LA)
G5	PARENTAL (LB)
G6	PARENTAL (LC)
G7	PARENTAL (LD)

QUADRO 1 - LINHAGENS DE MILHO UTILIZADAS NO ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: LA, LB, LC e LD tiveram seus nomes preservados pela Empresa “Semília Genética e Melhoramento LTDA”.

Com o objetivo de encontrar e caracterizar fungos dematiáceos isolados de milho e pertencentes ao gênero *Curvularia*, foi realizado o experimento de

isolamento. A partir desse experimento e de características macro e micromorfológicas foram selecionadas amostras para confirmação da identificação.

Foram utilizados 45 isolados de *Curvularia* neste trabalho, todos isolados de milho e 2 provenientes do Hospital de Clínicas de Curitiba. Destes, 23 foram isolados neste trabalho e 24 foram cedidos por outros autores para ampliar as análises de variabilidade. Todos os isolados de *Curvularia* estão apresentados no Quadro 2.

ISOLADOS	ANO	LOCAL
CUAP05 ¹ CUAP06 ¹	2009	Curitiba – PR
G14203-B(6-1) G16 201-A (4-1) ² G16 302-B (2-1) ² G16 308-A (5-1) ² G16 405-A (6-1) ² G16 506-A (1-1) ² G19 107-A (4-1) ² G19 304-B (1-1) ² G19 307-A (6-1) ² G19 307-B (2-1) ² G19 403-B (5-1) ² G19 506-B (2-2) ² G2 307-A (6-2) ² G2 501-A (2-1) ² G3 107-A (3-1) ² G4 104-A (6-1) ² G4 208-A (5-1) ² G4 308-B (2-1) ² G4 310-B (6-1) ² G4 408-A (6-1) ² G4 408-B (4-1) ² G4 501-A (5-1) ²	2007	Palotina – PR
L1G2 ³ L1G5P2 A ³ L1G5P2 B ³ L1G5P2 C ³ L1G6 ³ L2G1 ³ L2G4 ³ L2G5 ³ L2G5P1 ³ L3G1 ³ L3G2 ³ L3G3 ³ L3G4 ³ L3G5 ³ L3G6 ³ L4G1 ³ L4G2 ³ L4G5P1 A ³ L4G5P1 B ³ L4G5P1 C ³ L5G5P2 A ³ L5G5P2 B ³ L5G5P2 C ³	2009	Campo Largo – PR

QUADRO 2 - ISOLADOS DE *Curvularia* spp. OBTIDOS DE PLANTAS DE MILHO, UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Isolados gentilmente cedidos por:

1 - Prof^a Rosangela Pinheiro, Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR, Curitiba, PR.

2 - Prof^a Dr^a Patricia Dalzoto, Departamento de Microbiologia e Patologia Básica, da UFPR, Curitiba, PR. Isolados de milho, provenientes da Estação Experimental da Monsanto. Palotina- PR.

3 - Isolados obtidos no presente trabalho, a partir das linhagens de milho pertencentes à Empresa "Semília Genética e Melhoramento LTDA.", plantadas na região de Bateias, Campo Largo, PR.

Os microrganismos usados para os testes de antagonismo e atividade antimicrobiana foram: *Fusarium* sp. 151-2, fitopatógeno da cultura do milho, *Trichoderma* sp. CNBP2F16, fitopatógeno da cultura do café e *Guignardia citricarpa*, linhagens PC 13/96 e 33/05, agente causal da Mancha Preta de Citros (MPC). Todas pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná.

3.2 PREPARO DO MATERIAL

Meios de cultura, soluções, espátulas, greis de porcelana, pistilos e palitos de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera a 120°C, por 20 minutos. Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180° C por 4 horas.

3.3 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

3.3.1 Meio Batata – Dextrose - Ágar (BDA)

Batata descascada e cortada	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000,0 mL

As batatas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 20 minutos. Foi filtrado com uma peneira, e adicionada dextrose ao caldo e completou-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade e logo depois acrescentado o ágar.

3.3.2 Meio Completo (MC)

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

Os ingredientes foram misturados, exceto o ágar, em água destilada sob agitação. Completou-se o volume para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Acrescentou se o ágar.

3.3.3 Lactofenol azul de algodão

Ácido láctico	20,0 g
Cristais de fenol	20,0 g
Glicerina	20,0 g
Azul de algodão (Metyl Blue Difco)	0,05 g
Água destilada q.s.p.	20,0 mL

Cristais de fenol foram derretidos em banho-maria para posterior adição dos demais componentes. Depois de 24 horas, filtrou-se e armazenou-se em frasco escuro.

3.3.4 Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido para - Aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Água destilada esterilizada q.s.p.	100,0 mL

Aquecimento em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenamento em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

3.3.5 GelRed™ (Biotium, Estados Unidos)

O GelRed™ foi adquirido a uma concentração de 10.000X em DMSO. (Após, 1µl deste e adicionado a 5000µl de Tampão de Amostra 6X, sendo nomeado agora de tampão GelRed™ 2x). Foram adicionados 3 µL de em cada 25 µL de amostra e a cada 10 µL de marcador. A utilização do tampão GelRed™ 2x dispensa a utilização do brometo de etídio.

3.3.6 Marcador de Peso Molecular (DNA de fago lambda clivado com *HindIII* Gibco)

O marcador de peso molecular do DNA foi fornecido concentrado e no momento do uso diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 1 µL do tampão da amostra: 4 µL de água Milli-Q esterilizada. Na corrida eletroforética foi utilizado 5 µL (50ng/µL) do marcador.

3.3.7 Marcador de Peso Molecular (DNA *Ladder* 100pb Ludwig Biotec)

O marcador de peso molecular foi fornecido concentrado e no momento do uso diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 2 µL do tampão da amostra: 7 µL de água Milli-Q esterilizada. Na corrida eletroforética foram utilizados 10 µL (utilizado conforme instrução e concentração do fabricante) do marcador.

3.4 CAMPO

O plantio das sementes do milho, de três genótipos parentais e quatro híbridos, ocorreu na Empresa Semília Genética e Melhoramento (FIGURA 4) em novembro de 2008. Devido a alterações climáticas a coleta das folhas só pode ser realizada no final de janeiro de 2009.



FIGURA 4 – ASPECTO DO PLANTIO (DOS MILHOS) NA EMPRESA “SEMÍLIA GENÉTICA E MELHORAMENTO LTDA”, LOCALIZADA NA REGIÃO DE BATEIAS, CAMPO LARGO, PR.

FONTE: O autor (2009).

3.5 EXPERIMENTO A CAMPO

Foram plantadas 48 sementes, tratadas com fungicida e inseticida, para cada um dos sete genótipos de milho dispostos aleatoriamente em seis linhas com repetições de quatro plantas por material. Nas laterais das linhas foi plantada uma bordadura com sementes do híbrido H2 a uma distância de 20 cm entre as plantas. A distância entre linhas foi de 70 cm, entre materiais foi de 60 cm e entre covas com as repetições de 20 cm. O solo recebeu 4% de adubo NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio) e o plantio foi irrigado a cada dois dias. Foi realizado o plantio de duas sementes por cova dispostas em 6 linhas, para posterior desbaste e manutenção de uma planta, ocorrido após o surgimento da 2ª para a 3ª folha verdadeira da planta, (cerca de 15 dias após o plantio). A coleta, ocorrida em janeiro de 2009, foi feita 75

dias após o plantio, próxima ao período de florescimento (que ocorre geralmente entre 60 e 65 dias) retardado alguns dias devido às condições do clima. As folhas coletadas foram submetidas ao isolamento de fungos endofíticos.

3.6 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos foram isolados de plantas aparentemente saudáveis, seguindo a metodologia descrita por Petrini (1991) e modificada por Pimentel (2006). Foram coletadas aproximadamente 5 folhas em diferentes plantas com 40 dias de cultivo, colhidas de forma aleatória. A coleta foi realizada em porções mais basais (folhas adultas).

As folhas foram lavadas em água corrente, sempre tomando as devidas precauções para não ferir o material e descartando o material danificado. Para o processo de desinfestação, primeiramente as amostras foram mergulhadas por duas vezes em água destilada esterilizada por 30 segundos cada e em seguida em solução de álcool etílico a 70 % por 1 minuto, em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 4 minutos, novamente em solução de álcool etílico a 70% por 30 segundos e três vezes em água destilada esterilizada por 1 minuto (PIMENTEL, 2006).

A seguir cada folha foi cortada assepticamente em pequenos fragmentos (5-7 mm) que foram transferidos para placas de Petri (100 mm) contendo o meio BDA (item 3.3.1) acrescido de tetraciclina (100mg/mL), totalizando 5 fragmentos por placa que correspondem a uma folha diferente. De cada repetição foram feitas placas controle contendo 0,1 mL da última água destilada esterilizada utilizada na lavagem, para verificação de possíveis fungos contaminantes (epifíticos), (PETRINI, 1986). As placas foram incubadas a 28°C, por 14 dias com observação diária para verificação do crescimento micelial. Após o início do seu crescimento em placas, pequenos fragmentos de ágar contendo pontas de hifas de cada fungo foram transferidos para tubos contendo meio BDA (item 3.3.1). Os tubos foram incubados a 28°C e, após crescimento, mantidos a 4°C.

3.7 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados que foram identificados por microscopia óptica como pertencentes ao gênero *Curvularia* foram selecionados para obtenção de colônia monospórica. Cada amostra foi incubada em placa de Petri com meio de cultura BDA a 28°C. Observou-se o crescimento da linhagem e monitorou-se o aparecimento de conídios com o auxílio de microscopia óptica. Fragmentos de hifas foram coletados e macerados em um tubo tipo Falcon esterilizado contendo 2 mL da solução de “Tween 80” 0,1%. A suspensão de conídios foi despejada em uma seringa contendo lã de vidro. Deste filtrado foram retirados 10 µL para contagem dos conídios em câmara de Neubauer. O filtrado foi diluído em solução salina a 10⁻² conídios/mL e a suspensão foi semeada em uma placa de Petri contendo meio BDA (item 3.3.1.) e com o auxílio de um alça de Drigalsky. O material foi incubado a 28°C. As colônias isoladas (puras) foram novamente repicadas, em tubos de ensaio contendo meio BDA (item 3.3.1), e após 4 dias em estufa 28°C, armazenadas em geladeira.

Estes isolados purificados foram utilizados para todos os ensaios subsequentes.

3.8 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DOS ISOLADOS

3.8.1 Caracterização morfológica

A diversidade morfológica das linhagens endofíticas foi constatada por meio de observações macroscópicas e microscópicas.

A identificação dos gêneros foi feita através de microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999) em meio BDA a 28°C de 7 a 14 dias. Após os respectivos períodos, as lamínulas foram retiradas, colocadas sobre uma lâmina e coradas com lactofenol azul de algodão (item 3.3.3). A visualização foi em microscópio óptico modelo Nikon *Eclipse 50i* e as imagens captadas com o auxílio do software Motic Images Version 2.0 ML.

As estruturas de reprodução foram analisadas e mensuradas com o programa *ImageTool* 3.00. Com os dados obtidos pela mensuração de 20 conídios de cada isolado foi realizado um teste de Scott Knott para gerar um agrupamento dos isolados de acordo com o tamanho do esporo.

O teste de Scott Knott (1974), teste estatístico reconhecido para a área de Ciências Biológicas, visa à separação de médias de tratamentos em grupos distintos, através da minimização da variação dentro e maximização da variação entre grupos. Os resultados são facilmente interpretados, devido à ausência de ambiguidade (BORGES, 2002).

As observações macroscópicas foram realizadas em colônias cultivadas a 28°C em meio BDA (item 3.3.1), em placas de Petri por 7 dias. Após o cultivo, as placas foram fotografadas. Quanto à mensuração do crescimento micelial, foram feitas cinco réplicas de cada isolado e coletados os dados de diâmetro das colônias nos 5°, 6° e 7° dia de crescimento em BDA a 28°C. Estes dados foram analisados no programa Assistat versão 7.5 beta (SILVA; AZEVEDO, 2008). A diversidade macromorfológica das colônias dos isolados de *Curvularia* spp. foi utilizada para a construção de uma matriz para a qual foram atribuídas notas de 0 a 1, onde 0 representa ausência e 1 representa a presença da característica. As características morfológicas analisadas foram: aspecto do micélio (cotonoso ou ralo), forma dos bordos (regulares ou não), coloração da colônia (preto, verde musgo ou cinza), reverso da colônia (com ou sem pigmentação escura), presença ou ausência de micélio sob o meio de cultura e também presença ou ausência de conídios em BDA, após 7 dias de cultura.

A matriz binária resultante (APÊNDICE 1) foi preparada no software Mesquite (MADDISON, 2009) para o formato NEXUS e analisada no software PAUP 4.1 (BETA 3) (SWOFFORD, 2003) para a geração de uma árvore seguindo o método da Parcimônia com a realização de 100 *bootstraps*.

3.8.2 Caracterização Molecular por Sequenciamento de Região ITS

3.8.2.1 Extração do DNA (RAEDER; BRODA, 1985; modificado por BLANCO, 1999)

O DNA genômico foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985), modificada por Glinke (1999) com algumas adaptações. Os isolados endofíticos foram cultivados em meio BDA durante três dias a 28°C, em um disco de celofane para facilitar a raspagem. O micélio foi coletado, raspando-se a colônia com um bisturi esterilizado. Na sequência este material foi liofilizado e congelado a menos 20°C ou utilizado para a extração. O micélio liofilizado foi macerado com a adição de nitrogênio líquido até formar um pó fino. Para cada grama de micélio, foi acrescentado 1 mL de Tampão de Extração (Tris-HCl pH 8,0 200 mM; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS (p/v) 1%). A solução foi homogeneizada e incubada durante 20 minutos em banho-maria a 70°C. Foi acrescentado um volume de fenol saturado e após agitação foi centrifugado durante 15 minutos a 5000 rpm. A fase aquosa foi coletada e colocada em um novo tubo e adicionado a este, um volume de Clorofane (fenol equilibrado e clorofórmio p.a. na proporção de 1:1). Foi centrifugado novamente, sob as mesmas condições. A fase aquosa foi coletada, como na etapa anterior e adicionada a um volume de Clorofil (clorofórmio 24 volumes; álcool isoamílico 1 volume), repetindo-se o processo de centrifugação, sob as mesmas condições. A fase aquosa foi coletada em um novo tubo onde foram adicionados isopropanol (equivalente a 60% do volume). O material foi incubado a – 20°C, *overnight*. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Então foi acrescentado 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 10000 rpm, durante 5 minutos. O álcool 70% foi descartado e o tubo invertido sobre uma folha de papel absorvente, onde foi mantido *overnight*. Após este período os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 200 µL de tampão TRIS-EDTA (Tris-HCl, pH 8,0 10mM; EDTA, pH 8,0 1mM) e adicionado 10% do volume de acetato de amônio 7M e 1 volume de isopropanol. As amostras foram mantidas no freezer a – 20 C° *overnight* e em seguida centrifugada a 12000 rpm por 20 minutos para então serem lavadas com álcool 70%. Após descartado o

álcool o tubo foi invertido sobre uma folha de papel absorvente e o material ressuspensionado em TRIS-EDTA.

Os resultados obtidos com esse protocolo não foram satisfatórios e por esse motivo foi inserida a etapa de limpeza com acetato de amônio 7M, com o objetivo de melhorar as amostras.

A integridade do DNA foi visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando-se como padrão de peso molecular o DNA do fago lambda (Gibco) clivado com *Hind* III. O gel foi corado com GelRed™ (item 3.3.5), observado sobre transiluminador de ultravioleta (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e fotodocumentado (Programa Digidoc it). A utilização do tampão GelRed™ 2x dispensa a utilização do brometo de etídio.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro de massa. A partir dos dados obtidos com a leitura do espectro as amostras foram diluídas para uso na concentração de 10 ng/μL. Para confirmação dos dados o gel de integridade foi analisado no programa LabWorks: UVP Bio - Imaging Systems (2003).

3.8.2.2 Sequenciamento das Regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA

A reação foi realizada com os *primers* V9G e ITS4 (QUADRO 3), ambos universais para fungos que permitem amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal (QUADRO 3 e FIGURA 5).

PRIMER	SEQUÊNCIA
V9G ¹	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'
ITS4 ²	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

QUADRO 3 - SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E NO SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA.

FONTE: De Hoog e Gerrits Van Den Ende (1998)¹. White e Morrow (1990)².

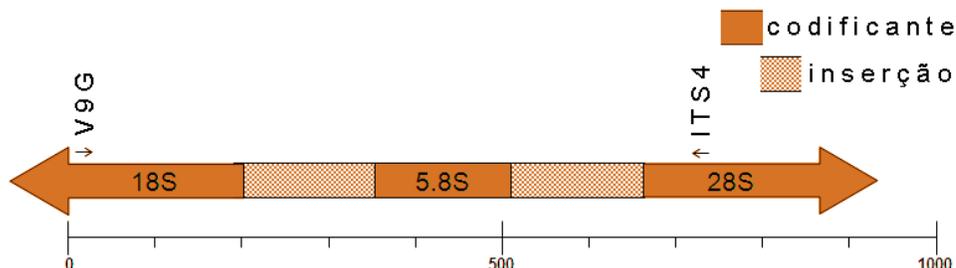


FIGURA 5 - REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL.

NOTA: Gene que codifica o RNA ribossômico com 475 pb, sendo 158 pb codificantes.
 FONTE: Stringari (2009).

As condições da reação foram as descritas por Stringari (2009): 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,06 μ M de *primers* (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, e volume final de 50 μ l. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*® (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72° C.

Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen*®).

3.8.2.3 Purificação do DNA

Aos produtos da amplificação das PCRs, com os *primers* descritos no QUADRO 3, foram acrescentados 50 μ L de PEG (PEG 20%, NaCl 2,5M) e incubados a 37°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao restante foi adicionado 125 μ L de etanol 80% gelado. Após 1 minuto em etanol 80% os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao restante adicionado 125 μ L de etanol absoluto gelado pela parede do tubo.

Novamente o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol evaporado. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 15 μ L de água ultrapura e deixado a temperatura ambiente por pelo menos 2 horas.

Após purificação, os produtos da PCR foram quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®)*.

3.8.2.4 Reação de Sequenciamento

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

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas envolvidas em papel alumínio com pouca luz incidente. Para reação foram utilizadas de 50 a 100 ng do produto da PCR purificado, 0,25 μ M do *primer* V9G (QUADRO 3), 2 μ L da mistura para sequenciamento ET (kit: *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE da Amersham Biosciences®*) e água ultrapura quando necessária para completar um volume final de 10 μ L. As mesmas condições foram aplicadas para o *primer* ITS4 (QUADRO 3).

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf®* (Modelo: *Mastercycler Gradient*), seguindo uma desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94° C, 15 segundos a 50° C e 1 minuto a 60° C.

3.8.2.5 Purificação da Reação de Sequenciamento

Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 1 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 μ L de etanol absoluto. A placa de sequenciamento foi fechada e o conteúdo misturado por inversão por 30 vezes. A placa foi então centrifugada por 45 minutos a 2500 rcf e o sobrenadante descartado. Após um *spin*

down (com a placa invertida em papel toalha) a 500 rcf, adicionou-se 100 µL de etanol 70% recém preparado. Seguiu-se uma centrifugação a 2500 rcf com a placa aberta. O sobrenadante foi novamente descartado e um *spin down* a 750 rcf foi realizado. As amostras foram colocadas na estufa a 37°C por 3 minutos e 10 µL de *Loading Solution* (kit: *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* da *Amersham Biosciences*®) foram adicionados a cada reação. A placa foi fechada com adesivo, envolvida em papel alumínio e agitada no vórtex por 1 minuto. Após um *spin* a 2500 rcf, a placa foi submetida à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo *MegaBACE* (*Amersham Biosciences*®).

Os parâmetros de eletroforese selecionados durante o sequenciamento foram: voltagem de injeção de 2kV, tempo de injeção de 70 segundos, voltagem da corrida de 6kV e tempo de corrida de 100 minutos.

As corridas efetuadas foram analisadas através de programas disponíveis no pacote de *softwares* do *MegaBACE*. O *Sequence Analyser* gerou os eletroferogramas de cada isolado e através do programa *ScoreCard* foram obtidas as informações estatísticas de cada sequência, como número de nucleotídeos obtidos e a eficiência.

3.8.2.6 Edição e Análise das Sequências

Obtidas as sequências consenso com o auxílio do PHRED – PHRAP (Ewin *et al.*, 1998) estas foram editadas por meio do programa MEGA 4.1 (Beta 3) (TAMURA *et al.*, 2007) e conferidas por inspeção visual. Após a obtenção da sequência consenso para cada isolado, estas foram analisadas pelo programa CLUSTAL incubado no próprio MEGA 4.1 (BETA 3) (TAMURA *et al.*, 2007).

Para a comparação das sequências obtidas com as de espécies já identificadas, buscou-se no *Genbank* sequências depositadas de regiões ITS de espécies de *Curvularia* (QUADRO 4).

Isolados obtidos no Genbank	Número de acesso
<i>Curvularia geniculata</i> MAFF 236895	AB245085
<i>Curvularia affinis</i> 106GP/T	GQ352486
<i>Curvularia inaequalis</i> CBS 185.47	AF120261
<i>Curvularia trifolii</i> wb403	AF455446
<i>Curvularia gudauskasii</i>	AF071338
<i>Cochliobolus lunatus</i> xsd08005	FJ792584

QUADRO 4 - ISOLADOS OBTIDOS NO GENBANK (COM RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO) PARA COMPARAÇÃO COM AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO PRESENTE ESTUDO.

FONTE: O autor (2010).

3.8.2.7 Análise Filogenética

Após a edição, alinhamento e análise prévia das sequências, estas foram submetidas ao software MEGA 4.1 (Beta 3) (TAMURA *et al*, 2007) para obtenção das árvores filogenéticas baseadas em distância. Para reconstrução filogenética da topologia e a estimativa dos ramos foi utilizado o algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ). A árvore de parcimônia com 250 *bootstraps* foi gerada com o auxílio do programa PAUP (SWOFFORD, 2003).

3.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Foram utilizados cinco isolados de *Curvularia* neste ensaio, selecionados inteiramente ao acaso. São eles: CUAP05, G3 107-A (3-1), LIG5P2 A, L3G2, L4G5P1 C.

Os fitopatógenos utilizados foram: *Guignardia citricarpa* PC13/96 e 33/05, *Trichoderma* sp. CNBP2F16 e *Fusarium* sp. 151-2.

Um experimento inicial utilizando a Técnica de Cultura Pareada (MARIANO,1993) foi realizado para avaliação do antagonismo dos isolados endofíticos contra fitopatógenos.

Os discos contendo micélio dos isolados endofíticos ou dos fitopatógenos ensaiados foram obtidos de colônias crescidas em BDA (item 3.3.1), durante sete

dias, incubados em estufa BOD a 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Após este período foram retirados os discos da borda das colônias, com auxílio do vazador de rolhas.

Em placas de Petri contendo BDA (item 3.3.1), foi colocado um disco (Ø 10 mm) da cultura do fitopatógeno e no lado oposto, um disco com o isolado endofítico a ser avaliado, ambos a 1,0 cm da borda da placa. Após o pareamento, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas durante 7 dias em estufa a 28°C, com fotoperíodo de 12 h. Para cada isolado testado foram feitas cinco repetições. O controle recebeu apenas as linhagens de *Curvularia* sp. A avaliação foi realizada mediante mensuração do diâmetro da colônia comparando com o controle e observação das interações entre as colônias.

Após o período de 7 dias as colônias foram fotodocumentadas. Para a observação das hifas, foi retirado um fragmento da colônia e depositado em uma lâmina, com água destilada, para observação e fotodocumentação. O microscópio utilizado foi do modelo Nikon *Eclipse 50i* e o software utilizado para registro das imagens foi Motic Images Version 2.0 ML.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS

Com o objetivo principal de isolar fungos dematiáceos, da espécie *Zea mays*, foram selecionados 52 fungos endofíticos com aspecto de fungos negros. Destes, 23 foram identificados como pertencentes ao gênero *Curvularia* sp. (QUADRO 4), 19 apresentaram características microscópicas compatíveis com o gênero *Alternaria* sp. e 10 com o gênero *Bipolaris* sp. Os isolados pertencentes ao gênero *Curvularia* sp. foram selecionados para a realização deste trabalho.

As plantas de milho de onde foram isolados estes endofíticos apresentavam aspecto saudável, sem manchas foliares ou qualquer outra característica que pudesse ser identificada como sintoma de fitopatologia. Desta forma, os isolados obtidos foram considerados endofíticos. Os dematiáceos de gêneros sabidamente endofíticos, isolados neste estudo, corroboram com os autores Fisher, Petrini e Lappin Scott (1992) que também encontraram esses gêneros em isolamentos realizados em plantas de milho.

A origem dos isolados, de acordo com a linhagem de milho utilizada, está demonstrada no Quadro 5.

GENÓTIPO DO MILHO	ISOLADOS DE <i>Curvularia</i>
G1 (HÍBRIDO-G4 x G6)	L2G1 L3G1 L4G1
G2 (HÍBRIDO-G4 x G5)	L1G2 L3G2 L4G2
G3 (HÍBRIDO-G4 x G7)	L3G3
G4 (PARENTAL)	L2G4 L3G4
G5 (PARENTAL)	L1G5P2 A L1G5P2 B L1G5P2 C L2G5 L2G5P1 L3G5 L4G5P1 A L4G5P1 B L4G5P1 C L5G5P2 A L5G5P2 B L5G5P2 C
G6 (PARENTAL)	L1G6 L3G6
G7 (PARENTAL)	-

QUADRO 5 - ISOLADOS DE *Curvularia* spp. OBTIDOS A PARTIR DOS GENÓTIPOS HÍBRIDOS (G1, G2 E G3) E PARENTAIS (G4, G5, G6 E G7) DE *Zea mays*.

FONTE: O autor (2010).

Foram obtidos isolados de *Curvularia* spp. de genótipos parentais e híbridos (QUADRO 5). Apenas do parental G7 não foi obtido nenhum isolado de *Curvularia*. Ainda foi possível averiguar que, a partir do híbrido G3, foi obtido um único isolado de *Curvularia*. Este tem como um de seus parentais o genótipo G7 (QUADRO 5), do qual não foi obtido nenhum isolado deste fungo. Como não foram encontradas análises semelhantes na literatura, considerou-se que este foi o primeiro estudo que buscou relacionar o isolamento de *Curvularia* spp. a diferentes genótipos de uma mesma planta hospedeira. Também foi possível averiguar que a partir do genótipo

G5 (PARENTAL) foi obtido o maior número de isolados de *Curvularia*, sugerindo uma colonização diferenciada. Isso indica um processo co-evolutivo endófito-hospedeiro neste isolamento para os genótipos utilizados. Entretanto, novos isolamentos devem ser realizados para reforçar esta hipótese.

Pamphile e Azevedo (2002) observaram um processo de co-evolução em *Fusarium verticillioides*, endófito de milho. Observaram que certos genótipos de milho não possuíam *Fusarium*. Utilizaram RAPD para associar os isolados a seus respectivos genótipos no local analisado e separaram os endófitos por região de isolamento.

Poitevin *et al.* (2009), isolaram fungos endofíticos de diferentes genótipos de milho, variedades selvagens e comerciais utilizadas no Estado do Paraná. Os autores encontraram os dematiáceos *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Bipolaris* sp., sendo o primeiro mais frequente. Não foi observada relação entre o número de isolados e gêneros, e a variedade de milho de onde foram isolados.

Várias espécies de *Curvularia* são associadas a doenças em plantas (SIVANESAN, 1987; MOURA, 2001; DASGUPTA; SAHA; SAHA, 2005; SHAN *et al.*, 2008), animais e humanos (HERRA´EZ, REEZ E DUNSTAN, 2001; CARTER; BOUDREAUX, 2004; PIMENTEL, 2005). Apesar de seu isolamento frequente como endófito, este gênero também vem sendo isolado do ambiente, inclusive ambientes hospitalares (ZANON; NEVES, 1987; RICHARDSON; WARNOCK, 1993; CARMO *et al.* 2007). Nestes ambientes, os fungos de maior frequência de isolamento são *Curvularia* sp., *Penicillium* sp., *Micelia sterilia*, *Aspergillus* sp. e *Cladosporium* sp. Estes podem ser responsáveis por muitas doenças oportunistas como otites, quadros alérgicos, micoses, além de infecções urinárias, pulmonares e até sistêmicas (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Para averiguar se algum isolado endofítico de *Curvularia* pertence a alguma espécie descrita como patogênica ao homem, a animais ou plantas, foram realizadas análises morfológicas e moleculares.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

4.2.1 Caracterização morfológica

Os isolados foram inicialmente identificados segundo os critérios da chave de identificação de Sivanesan (1984). Foi realizada a caracterização macro e micromorfológica, após crescimento em meio de cultura BDA a 28°C como descrito por Barnett e Hunter (1987), Kern e Blevins (1999) e Hoog e Guarro (2004).

A caracterização macromorfológica de todos os 47 isolados de *Curvularia* spp. foi feita após 7 dias de crescimento em BDA (item 3.3.1) (FIGURA 7). O inóculo inicial foi padronizado com um furador de rolhas esterilizado de 10 mm de diâmetro. Foram feitas 5 repetições para cada isolado.

A caracterização micromorfológica foi feita principalmente pela observação dos conídios, estrutura importante para a identificação taxonômica deste gênero. A obtenção dos conídios foi realizada pela técnica de microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999). Após 7 dias a maior parte dos isolados esporularam. Os isolados L5G5P2 A, L5G5P2B, L5G5P2 C L2G5P2, G19 403-B (5-1), CUAP05, G4 501-A (5-1) esporularam somente com 14 dias de cultivo. Todas as linhagens foram fotodocumentadas com escala padrão de 20µm (FIGURA 7).

Algumas espécies possuem teleomorfo conhecido no gênero *Cochliobolus* Drechsler 1934, formando ascósporos filiformes paralelos ou frouxamente enrolados em espiral (LIMA; FURTADO, 2007), característica não evidenciada neste trabalho. Esporos sexuais de *Curvularia* são dificilmente encontrados e não há descrição de condições específicas para a obtenção destes ascósporos.

Watanabe (2002) descreveu a micromorfologia de diferentes espécies de *Curvularia*. Algumas características como conídio liso ou verrugoso (FIGURA 6–A); hilo (presente, ausente ou indistinto) (FIGURA 6–A), 4 ou 5 células; conídio elipsóide ou cilíndrico; curvado ou não formação de clamidosporos. Entre essas características algumas foram encontradas no presente estudo, sugerindo que os isolados pertencem ao gênero *Curvularia*.

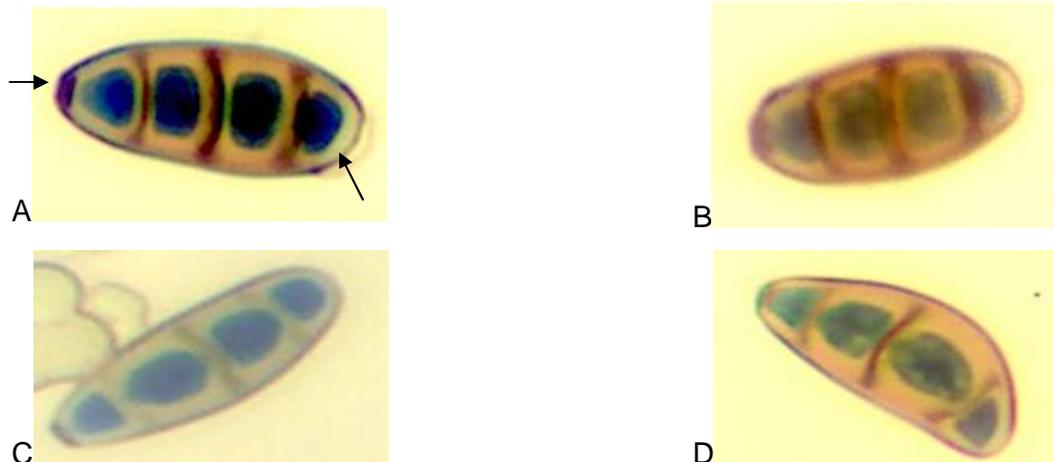


FIGURA 6 - ASPECTOS DO CONÍDIO.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Conídios corados com lactofenol azul de algodão (item 3.3.3).

A) ASPECTO DO CONÍDIO COM OS BORDOS LISOS E PRESENÇA DE HILO.

As setas indicam: seta da esquerda – hilo; seta da direita - bordos lisos.

Conídio pertencente ao isolado L2G5.

B) CONÍDIO CONTENDO 3 SEPTOS E EM FORMATO ELIPSÓIDE.

Conídio pertencente ao isolado L1G5P2 C.

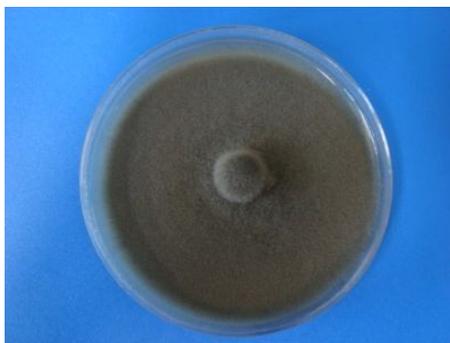
C) CONÍDIO APRESENTANDO A FORMA CILÍNDRICA.

Conídio pertencente ao isolado G16 302-B (2-1).

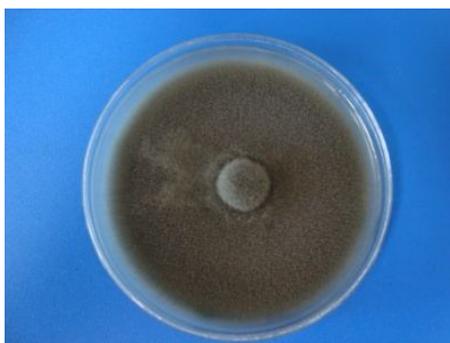
D) CONÍDIO CURVADO.

Conídio pertencente ao isolado G19 506-B (2-2).

Foram observadas algumas diferenças na micromorfologia, entre o grupo de isolados de Palotina - PR e o grupo de Campo Largo - PR. Os isolados provenientes da região de Campo Largo apresentam o conídio, na maior parte dos isolados, na forma elipsóide (FIGURA 6–B), enquanto o grupo de isolados de Palotina apresenta formas cilíndricas (FIGURA 6–C) ou curvados (FIGURA 6-D). Fatos que sugerem a existência de diferentes espécies, intergrupos e intragrupos. Essa hipótese foi corroborada pela análise da árvore de distância (FIGURA 9) gerada pelos dados moleculares.



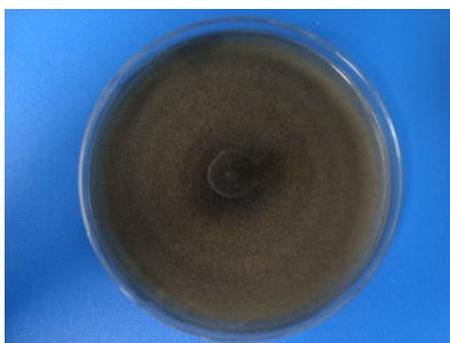
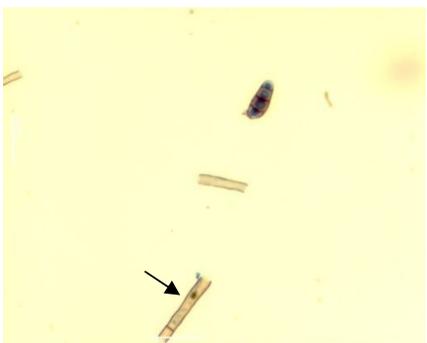
L3G6



L1G6



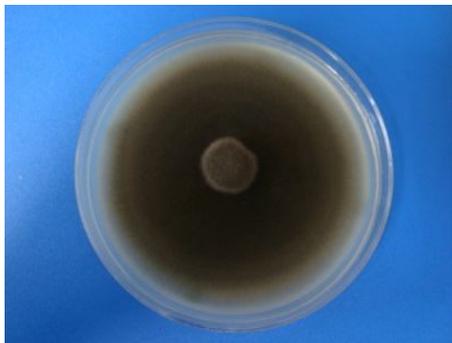
L3G4



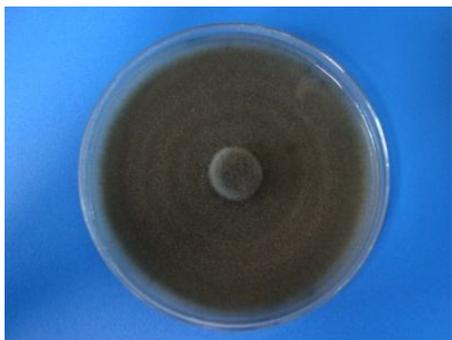
L4G2



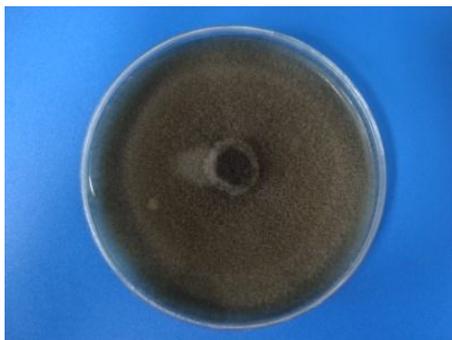
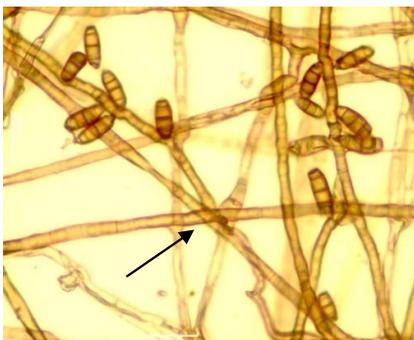
FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continua)



L2G4



L3G5



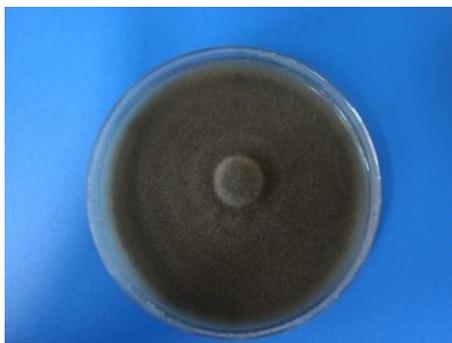
L2G1



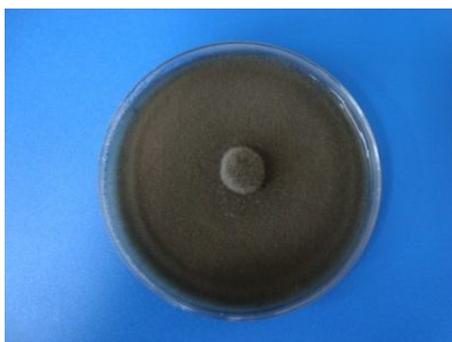
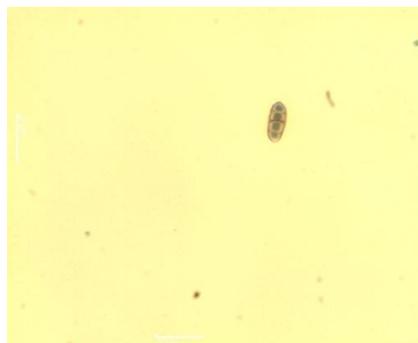
L4G1



FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



L1G2



L3G2



L3G3



L2G5



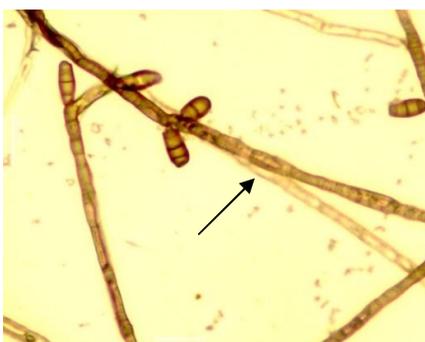
FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



L3G1



L2G5P1



L1G5P2 A



L1G5P2 B



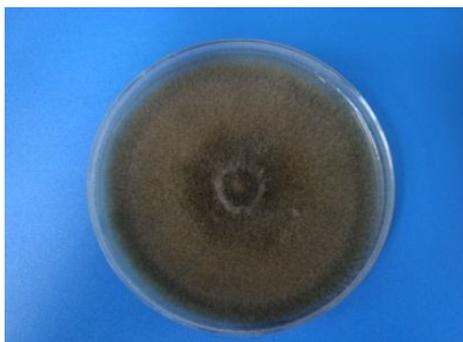
FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



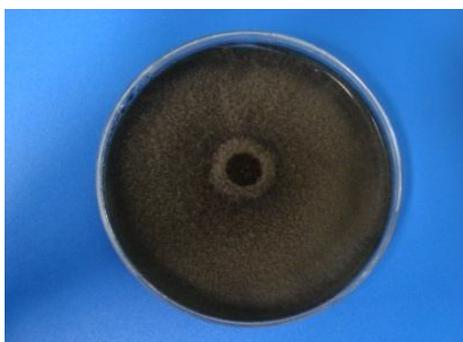
L1G5P2 C



L5G5P2 A



L5G5P2 B



L5G5P2 C

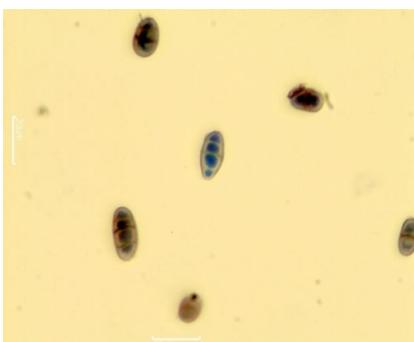
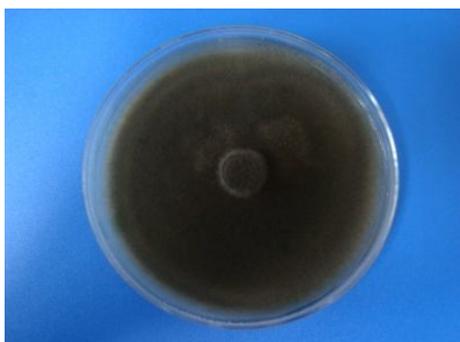
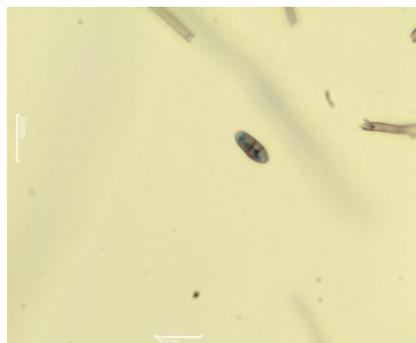


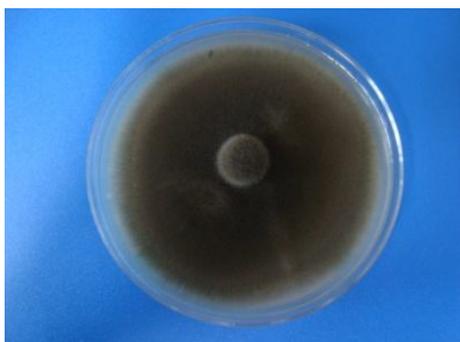
FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



L4G5P1 A



L4G5P1 B



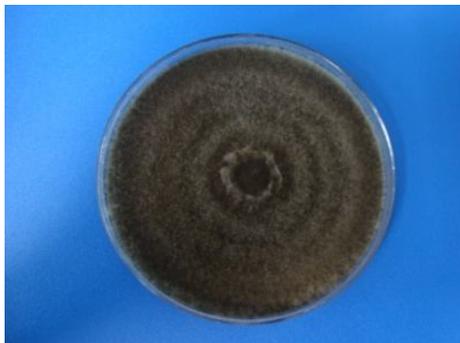
L4G5P1 C



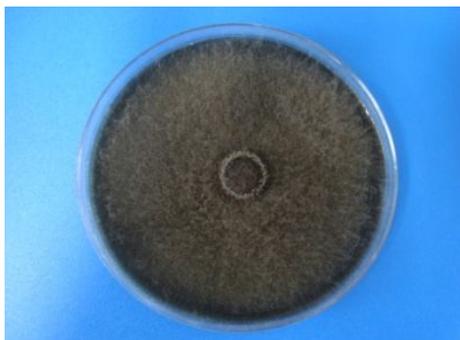
G2 307-A (6-2)



FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



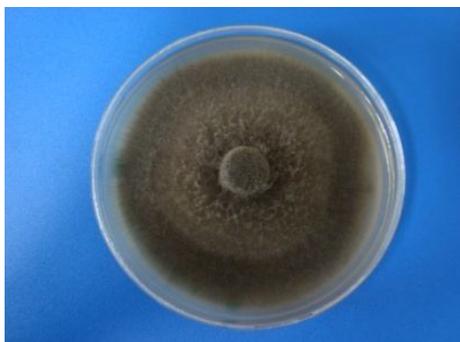
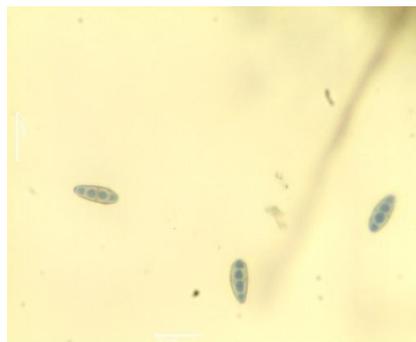
G2 501-A (2-1)



G3 107-A (3-1)



G4 308-B (2-1)



G4 310-B (6-1)



FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



G4 501-A (5-1)



G4 104-A (6-1)



G4 208-A (5-1)



G4 408-A (6-1)



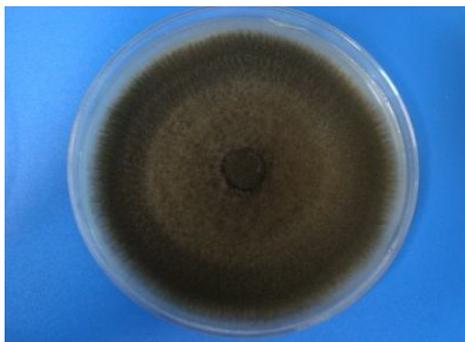
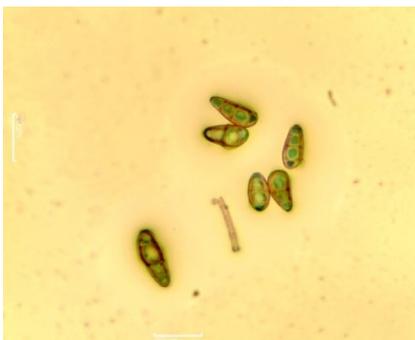
FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



G4 408-B (4-1)



G14 203-B (6-1)



G16 405-A (6-1)



G16 201-A (4-1)

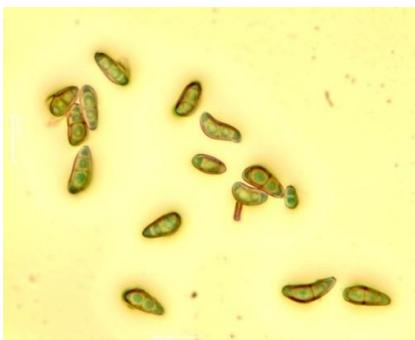
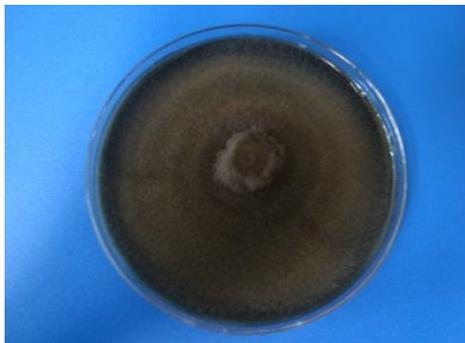


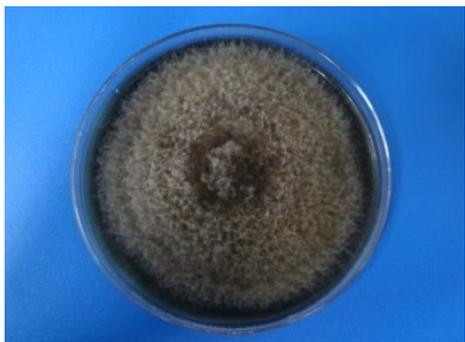
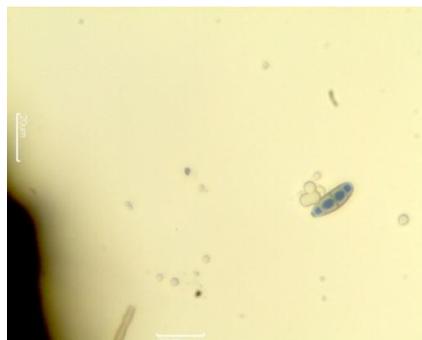
FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



G16 308-A (5-1)



G16 302-B (2-1)



G16 506-A (1-1)



G19 506-B (2-2)

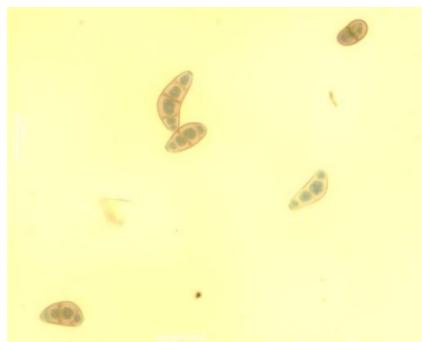
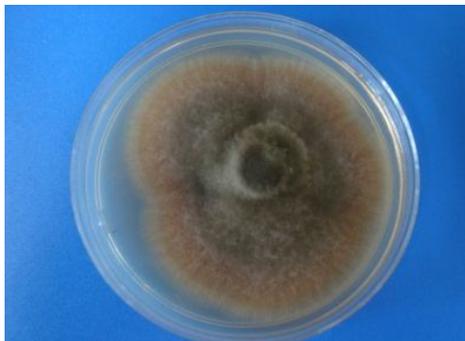
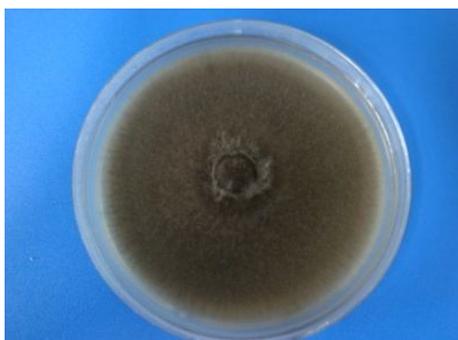


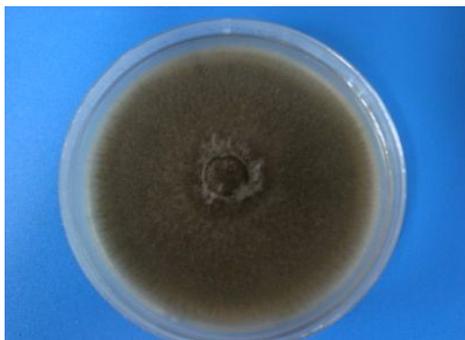
FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



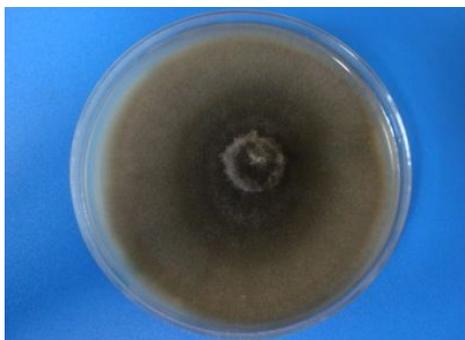
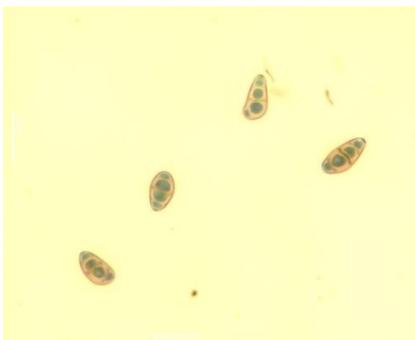
G19 403-B (5-1)



G19 307-A (6-1)



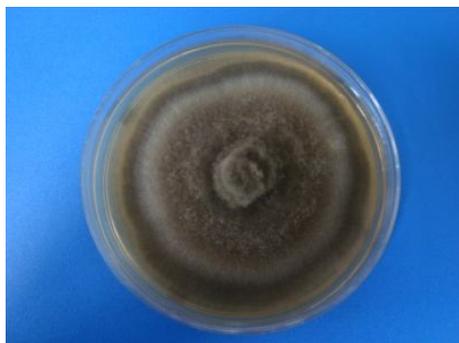
G19 304-B (1-1)



G19 307-B (2-1)



FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (continuação)



G19 107-A (4-1)



CU AP 05



CU AP 06



FIGURA 7 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA EM MEIO BDA (ITEM 3.3.1) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C E ASPECTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Curvularia*. (conclusão)

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: As setas indicam hifas de *Curvularia*, que são facilmente identificáveis por sua pigmentação. Foi utilizada escala de 20µm para mensuração dos conídios e aumento de 400x. Conídios corados com lactofenol azul de algodão (item 3.3.3).

As imagens foram analisadas com o programa *ImageTool* 3.00. Com os dados obtidos pela mensuração dos conídios foi realizado um teste de Scott Knott para gerar um agrupamento dos isolados de acordo com a variação de tamanho do esporo, demonstrado na Tabela 1.

O teste de Scott Knott (1974) visa à separação de médias de tratamentos em grupos distintos, através da minimização da variação dentro e maximização da variação entre grupos. Os resultados são facilmente interpretados, devido à ausência de ambiguidade (BORGES, 2002).

A análise estatística da mensuração dos conídios, baseada no teste de Scott-Knott, separou os isolados em quatro morfogrupos artificiais formados de acordo com o tamanho do esporo (TABELA 1). Os pertencentes ao grupo “A” detêm os maiores conídios em relação aos outros isolados. O grupo “D” é formado pelos menores conídios. Porém, a mensuração dos esporos não gerou dados suficientes para a separação dos isolados originários da Estação Experimental da Monsanto, da Empresa Semília e dos provenientes de Curitiba. Uma hipótese provável é que os isolados pertençam a espécies diferentes, pois se diferenciam pela forma dos conídios (CORBETTA, 1964). Os isolados de Campo Largo apresentaram, em sua maioria, forma elipsóide e os de Palotina apresentaram forma cilíndrica ou curvada.

Quanto ao crescimento micelial foi realizada análise estatística baseada no teste de Scott-Knott (TABELA 2), o qual separou os isolados em oito grupos de acordo com seu crescimento a cada dia. Os pertencentes ao grupo “A” tiveram a maior taxa de crescimento durante os dias observados. Os do grupo “B” tiveram uma taxa menor com relação ao grupo “A” e assim sucessivamente com os grupos “C”, “D”, “E”, “F”, “G” e “H”. Somente o 5º dia de mensuração apresentou uma grande variabilidade, sendo que nos dias posteriores o crescimento das colônias não forneceu diferenças significantes. Não foi possível estabelecer uma relação entre grupos de isolados de diferentes regiões, tamanho de esporo e crescimento micelial, reforçando a necessidade de uma análise molecular para uma boa identificação.

TABELA 1 – ISOLADOS DE *Curvularia* sp. AGRUPADOS DE ACORDO COM O TAMANHO DO CONÍDIO.

	COMPRIMENTO	LARGURA
G2 307-A (6-2)	A	A
G4 501-A(5-1)	A	A
G4 308-B (2-1)	A	A
L1G5P2 A	A	A
L1G5P2 B	A	A
L3G2	A	A
G2 501-A (2-1)	A	A
L2G4	A	A
L5G5P2 B	A	A
G14 203-B (6-1)	A	A
G16 403-B(5-1)	A	A
G4 408-B (4-1)	B	A
G16 308-A (5-1)	B	A
G16 506-A(1-1)	B	A
G19 307-B (2-1)	B	A
G19 403-B (5-1)	B	A
G19 506-B (2-2)	B	A
L1G2	B	A
L1G5P2 C	B	A
L1G6	B	A
L2G1	B	A
L3G4	B	A
L4G2	B	A
L4G5P1 C	B	B
L5G5P1 A	B	A
L2G5	B	A
L4G1	B	A
G16 405-A (6-1)	C	B
G4 208-A (5-1)	C	B
L3G1	C	B
L3G3	C	B
L4G5P1 B	C	B
CUAP 05	C	B
CUAP06	C	B
G19 107-A (4-1)	C	B
G4 310-B(6-1)	D	B
G4 104-A (6-1)	D	C
G19 304-B (1-1)	D	C
G16 302-B (2-1)	D	C
G16 201-A (4-1)	D	B
G16 307-B (2-1)	D	B
L3G5	D	B
L3G6	D	C
L4G5P1 A	D	C
L5G5P2 C	D	C
G3 107- A (3-1)	D	C
L2G5P1	D	C

FONTE: O Autor (2009).

NOTA: A>B>C>D.

“A” representa os grupos com o maior conídio; “D” representa os de menor conídio, separados por comprimento e largura do conídio. Letras iguais indicam valores estatisticamente iguais. Dados no apêndice 2.

TABELA 2 - ISOLADOS AGRUPADOS POR CRESCIMENTO MICELIAL

Linhagem	Dia 5	Dia 6	Dia 7
L2G4	E	B	A
L1G5P2 A	B	A	A
G4 501-A (5-1)	B	A	A
L2G1	C	A	A
L4G1	B	A	A
L2G5P1	D	A	A
L1G5P2 C	B	A	A
L1G2	A	A	A
L4G5P1 A	A	A	A
G19 304-B (1-1)	B	A	A
L4G5P1 C	C	A	A
L4G2	A	A	A
L5G5P2 C	B	A	A
G2 501-A (2-1)	A	A	A
L3G5	B	A	A
G4 408-B (4-1)	D	A	A
L2G5	B	A	A
L3G3	B	A	A
L3G1	A	A	A
L1G5P2 B	C	A	A
L3G2	B	A	A
G19 506-B (2-2)	A	C	A
L5G5P2 A	B	A	A
G16 308-A (5-1)	B	A	A
G16 506-A (1-1)	C	A	A
L3G6	B	A	A
L1G6	B	A	A
G16 405-A (6-1)	B	A	A
G4 310-B (6-1)	C	A	A
G 19 307-A (6-1)	B	A	A
L4G5P1 B	C	A	A
G16 302-B (2-1)	D	B	B
G19 403-B (5-1)	E	B	B
CU AP 05	E	C	B
G14 203-B (6-1)	D	B	B
G19 107-A (4-1)	D	B	B
G4 208-A (5-1)	D	B	B
G3 107-A (3-1)	A	A	B
G16 307-B (2-1)	E	C	B
G4 308-B (2-1)	D	B	B
L3G4	B	B	B
G4 408-A (6-1)	F	D	C
G4 104-A (6-1)	F	E	D
G 16 201-A (4-1)	F	E	D
L5G5P2 B	F	F	E
G2 307-A (6-2)	G	G	F
CU AP 06	H	H	G

FONTE: O Autor (2009)

NOTA: A>B>C>D>E>F>G>H.

“A” representa o grupo com maior diâmetro de colônia; o “H” representa o grupo de menos diâmetro de colônia considerando o 5º, 6º e 7º dia de crescimento. Letras iguais indicam valores estatisticamente iguais. Dados no apêndice 3.

O agrupamento das características macromorfológicas analisadas, como forma dos bordos, aspecto, coloração da colônia e esporulação gerou uma matriz binária de caracteres (APÊNDICE 1). Tal matriz foi preparada no software Mesquite (MADDISON, 2009) para o formato NEXUS e analisada no software PAUP (SWOFFORD, 2003) para a geração de uma árvore seguindo o método da Parcimônia com a realização de 100 *bootstraps* (FIGURA 8). O método de parcimônia privilegia a árvore de menor número de passos, ou seja, a hipótese mais simples.

Como resultado, a árvore consenso tem 8 passos (mudanças de estado de caráter) de comprimento, um índice de Consistência (IC), que procura avaliar o grau de homoplasias de uma árvore filogenética, de 0,75 e um índice de Homoplasia (HI) de 0,25 (respectivamente 0,7143 e 0,2857 ao ser removido o caráter não informativo). Na análise de *bootstrap* foi encontrado apenas um ramo com suporte robusto, compreendendo as linhagens G19 107-A (4-1), G19 304-B (1-1) (linhagens provenientes de Palotina - PR) e L2G5P1, L4G5P1 C (linhagens provenientes de Campo Largo-PR) com uma sustentação de 74%, ou seja, nas 100 repetições esse ramo permaneceu junto em 74 vezes. Entretanto, tal agrupamento não foi evidenciado quando as características tamanho do conídio e crescimento micelial foram analisadas (TABELAS 1 e 2). Tendo em vista as características utilizadas na matriz de dados, sugere-se que esses isolados agruparam, pois todos possuem uma colônia de coloração verde musgo.

Os demais agrupamentos apresentaram valores abaixo de 70% não sendo sustentados estatisticamente.

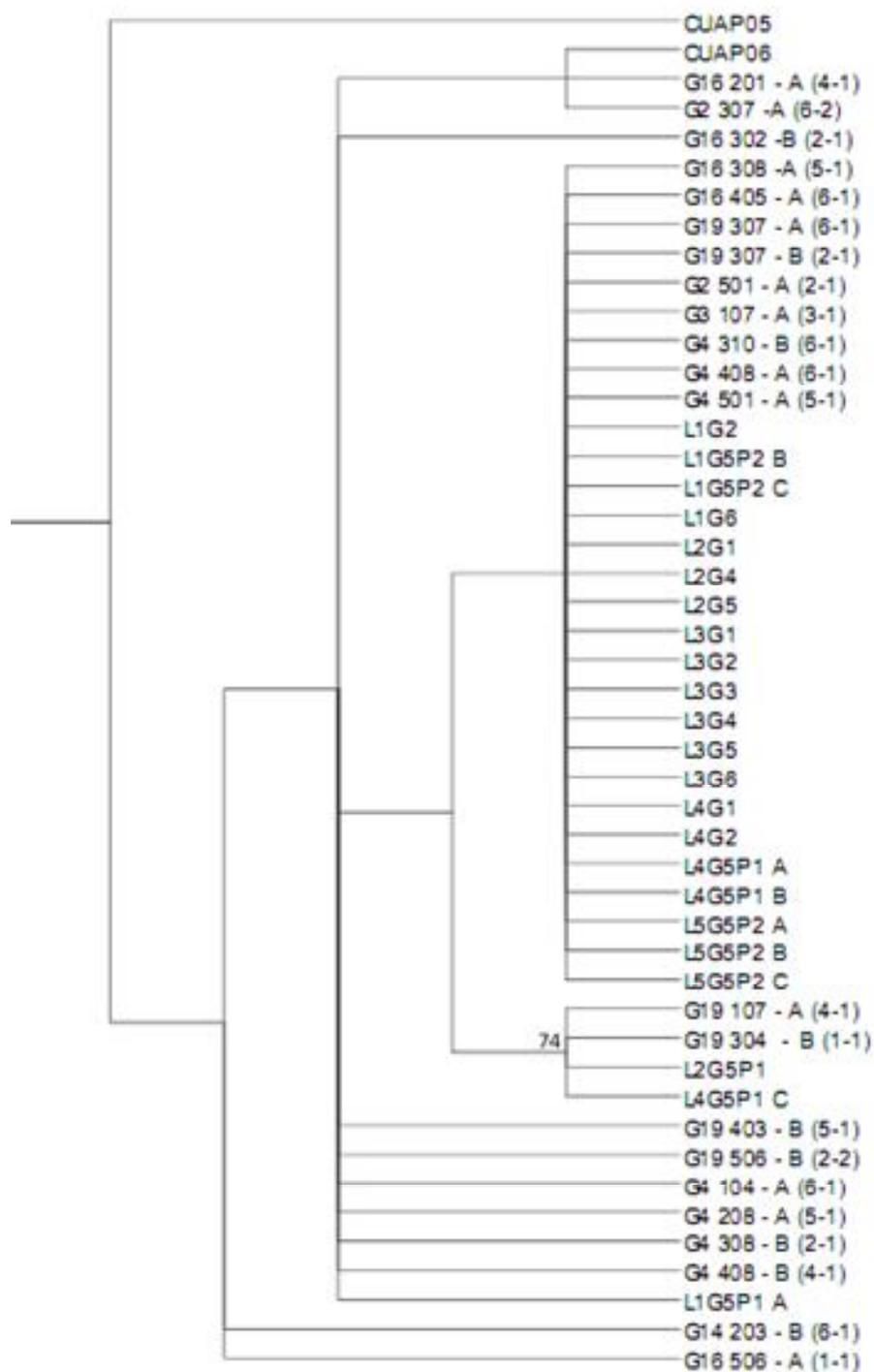


FIGURA 8 - ÁRVORE GERADA PELO SOFTWARE PAUP SEGUINDO O MÉTODO DA PARCIMÔNIA A PARTIR DOS DADOS OBTIDOS QUANTO A FORMA DOS BORDOS, ASPECTO, COLORAÇÃO DA COLÔNIA E ESPORULAÇÃO DE *Curvularia* spp.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Árvore gerada com 100 *bootstraps* e o valor representado demonstra o índice de consistência do ramo.

Corroborando com dados da literatura (SUN, 2003), os resultados obtidos a partir das análises morfológicas revelaram uma elevada variabilidade morfológica dos isolados de *Curvularia*, o que dificulta a delimitação de espécies quando se utiliza este marcador. Estudos sobre morfologia envolvendo o gênero *Curvularia* são escassos e não fornece dados suficientes para se propor uma identificação em espécie. Segundo Sun (2003), a análise morfológica deste gênero não dá suporte a uma identificação profunda, necessitando de uma análise baseada em outro marcador, como por exemplo, o sequenciamento da região ITS do DNAr.

4.2.2 Caracterização molecular

Tendo em vista a incerteza na diferenciação de espécies do gênero *Curvularia* baseada na chave de identificação Watanabe (2002) (ANEXO 2) (QUADRO 5), foi realizado o sequenciamento das regiões ITS-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal dos 47 isolados. Após o sequenciamento desta região foram obtidas sequências com 638 a 767pb de 37 isolados. Comparando-se as sequências obtidas com as depositadas no banco de dados NCBI (QUADRO 4) os isolados apresentaram maior identidade genética (QUADRO 6) com *Cochliobolus* sp. (relatado como forma teleomórfica do gênero *Curvularia*), *Cochliobolus lunatus*, *Curvularia trifolii*, *Ascomycete* sp. No Quadro 6 também está relacionada a identidade morfológica dos isolados de acordo com a chave de identificação de Watanabe (2002). Na maioria dos casos, não há concordância entre a identificação morfológica e a identidade fornecida por similaridade das sequências ITS.

Origem dos Isolados	Isolados	Identificação por Morfologia	% de Identidade Genética	Espécie	Código de Acesso Genbank
Curitiba – PR	CUAP05	<i>C. lunata</i>	98	<i>Cochliobolus lunatus</i>	DQ337381. 1
	CUAP06	<i>C. brachyspora</i>	86	<i>Ascomycete</i> sp.	AM410605. 1
Palotina - PR	G16 201-A (4-1)	<i>C. brachyspora</i>	94 - 99	<i>Cochliobolus</i> sp.	FJ235087. 1
	G16 302-B (2-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G16 308-A (5-1)	<i>C. lunata</i>			
	G16 405-A (6-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G16 506-A (1-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G16 403-B (5-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G19 107-A (4-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G19 304-B (1-1)	<i>C. clavata</i>			
	G19 307-A (6-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G19 307-B (2-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G19 506-B (2-2)	<i>C. lunata</i>			
	G14 203-B (6-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G2 307-A (6-2)	<i>C. brachyspora</i>			
	G2 501-A (2-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G3 107-A (3-1)	<i>C. lunata</i>			
	G4 104-A (6-1)	<i>C. lunata</i>			
	G4 310-B (6-1)	<i>C. brachyspora</i>			
	G4 308-B (2-1)	<i>C. clavata</i>			
	G4 408-A (6-1)	<i>C. lunata</i>			
	G4 408-B (4-1)	<i>C. pallescens</i>			
G4 208-A (5-1)	<i>C. lunata</i>				
G4 501-A (5-1)	<i>C. lunata</i>				
Campo Largo - PR	L1G2	<i>C. brachyspora</i>	97	<i>Curvularia trifolii</i>	EF600959. 1
	L4G5P1 C	<i>C. brachyspora</i>	98	<i>Curvularia trifolii</i>	AF212310. 1
Campo Largo - PR	L1G5P2 A	<i>C. clavata</i>	91-96	<i>Cochliobolus lunatus</i>	DQ337381. 1
	L1G5P2 B	<i>C. clavata</i>			
	L1G5P2 C	<i>C. brachyspora</i>			
	L1G6	<i>C. brachyspora</i>			
	L2G1	<i>C. brachyspora</i>			
	L2G4	<i>C. brachyspora</i>			
	L2G5	<i>C. brachyspora</i>			
	L3G1	<i>C. brachyspora</i>			
	L3G2	<i>C. brachyspora</i>			
	L3G3	<i>C. brachyspora</i>			
	L3G4	<i>C. brachyspora</i>			
	L3G5	<i>C. brachyspora</i>			
	L3G6	<i>C. clavata</i>			
	L4G1	<i>C. clavata</i>			
	L4G2	<i>C. brachyspora</i>			
	L2G5P1	<i>C. brachyspora</i>			
	L4G5P1 A	<i>C. brachyspora</i>			
	L4G5P1 B	<i>C. brachyspora</i>			
	L4G5P1 C	<i>C. brachyspora</i>			
	L5G5P2 A	<i>C. brachyspora</i>			
L5G5P2 B	<i>C. brachyspora</i>				
L5G5P2 C	<i>C. brachyspora</i>				

QUADRO 6 – IDENTIDADE DOS ISOLADOS POR MORFOLOGIA E POR COMPARAÇÃO COM SEQUÊNCIAS DE REGIÃO ITS DEPOSITADAS NO GENBANK.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: A identificação morfológica foi realizada de acordo com Watanabe, 2002 (ANEXO 2).

Existe uma grande dificuldade em se trabalhar com as sequências deste gênero, pois são escassas no NCBI. A falta de artigos publicados diminui ainda mais a confiabilidade nos dados depositados.

A Figura 9 mostra a árvore de distância gerada com o auxílio do programa MEGA 4.1 (BETA3) com 10000 *bootstraps*. Para essa análise foi escolhido como *outgroup* a linhagem *Pestalotiopsis vismae* 48JAES isolada por Figueiredo (2007) e pertencente à coleção biológica do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná.

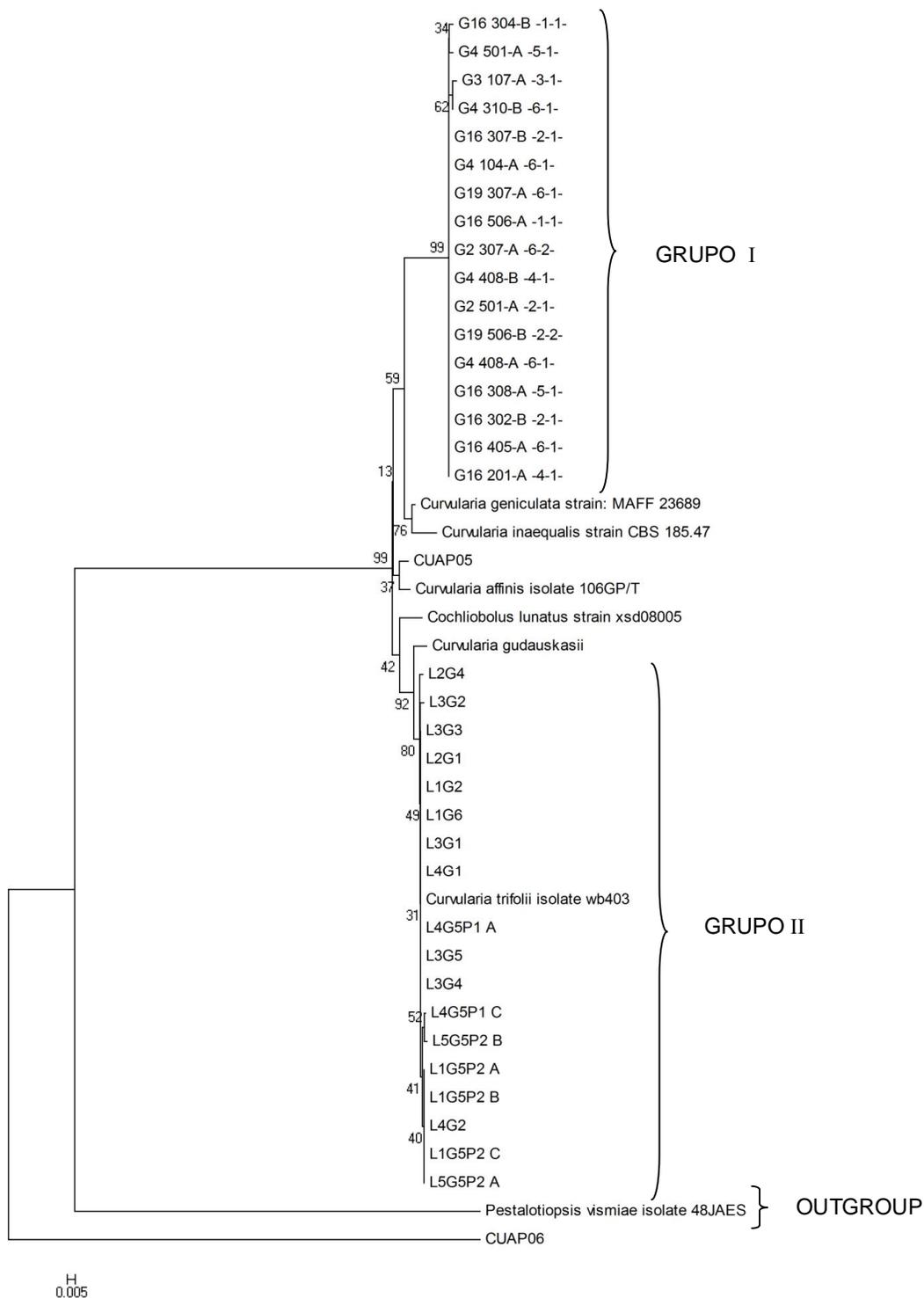


FIGURA 9 – ÁRVORE DE DISTÂNCIA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS-5,8S-ITS2 DO rDNA PELO MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING.

FONTE : O autor (2010).

NOTA: Grupo I - Estação Experimental da Monsanto (Palotina-PR).

Grupo II – Empresa Semília Genética e Melhoramento LTDA (Campo Largo-PR).

Árvore gerada com 10000 *bootstraps*. Os valores representados demonstram os índices de consistência dos ramos.

De acordo com a árvore de distância o primeiro grupo formado é composto por isolados provenientes da Estação Experimental da Monsanto e possui um ramo com índice de sustentação de 99%, sendo que dois isolados têm um ramo não sustentado estatisticamente (62%). O grupo formado na árvore demonstra pouca variabilidade e corrobora o agrupamento formado pela similaridade genética obtida através do *Genbank*, onde todos os isolados são compatíveis com *Cochliobolus* sp.

O segundo grupo apresenta grande variabilidade e diferentes valores de índices de sustentação. Estes isolados, quando comparados a sequências do *Genbank* se aproximam de *Cochliobolus lunatus* com identidade genética de 91 a 96%. Os isolados L1G2 E L4G5P1 C apresentam 97 e 98% de identidade com *Curvularia trifoli* wb403, cuja sequência foi obtida no *Genbank*. Estes isolados são todos provenientes das linhagens de milho da Empresa “Semília Genética e Melhoramento LTDA”. O isolado CUAP06 do Hospital de Clínicas (sem origem definida) ficou muito distante dos demais isolados identificados como *Curvularia* e não agrupou com nenhum outro isolado. A hipótese mais provável é que seja uma espécie desconhecida e provavelmente de outro gênero, pois quando comparada com sequências do NCBI a maior identidade genética encontrada, foi de 86% com um *Ascomycete* sp. Desta forma, provavelmente temos mais de uma espécie de *Curvularia* neste complexo.

A árvore gerada pelo método de Parcimônia (FIGURA 10), com 250 *bootstraps* demonstrou que a separação dos grupos de Campo Largo e Palotina se mantiveram com um ramo de 100% de sustentação, dados que corroboram a separação destes grupos na árvore de Distância. Novamente o grupo de Campo Largo ficou próximo ao isolado referência *Curvularia trifolli*, mas também apresentou proximidade com *C. gudauskasii* e *Cochliobolus lunatus*. Ainda, esta análise mostrou uma pequena variabilidade no primeiro grande grupo, mas com ramos de baixa sustentabilidade estatística. O isolado CUAP06 manteve-se em um ramo distante dos demais fornecendo assim sustentação à hipótese de que ele realmente pertence a um gênero distinto aos demais isolados.

Curvularia trifolli é um patógeno de plantas e foi descrito como agente causal do trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.), quando o trevo apresenta manchas necróticas, na forma de V, a partir das margens dos folíolos, levemente roxas, devido à ação de fungo (DRESCH, 2003). *Curvularia lunata* (anamorfo de

Cochiobolus lunatus) é um conhecido patógeno de plantas, humanos e animais, sendo a espécie mais frequentemente causadora de infecções em pacientes com o sistema imune intacto (CARTER; BOUDREAU, 2004). Shan *et al.* (2008), isolaram *Curvularia lunata* de 14 áreas de produção de milho, na Província de Hebei, na China. Não existem relatos até o presente momento, sobre o isolado *C. gudauskasii* dificultando assim uma descrição sobre a espécie.

Assim os isolados utilizados neste trabalho se aproximaram geneticamente das linhagens citadas como patogênicas de animais e plantas. Assim provavelmente as plantas sadias de milho de onde se isolou os fungos analisados são depositárias de espécies fúngicas patogênicas.

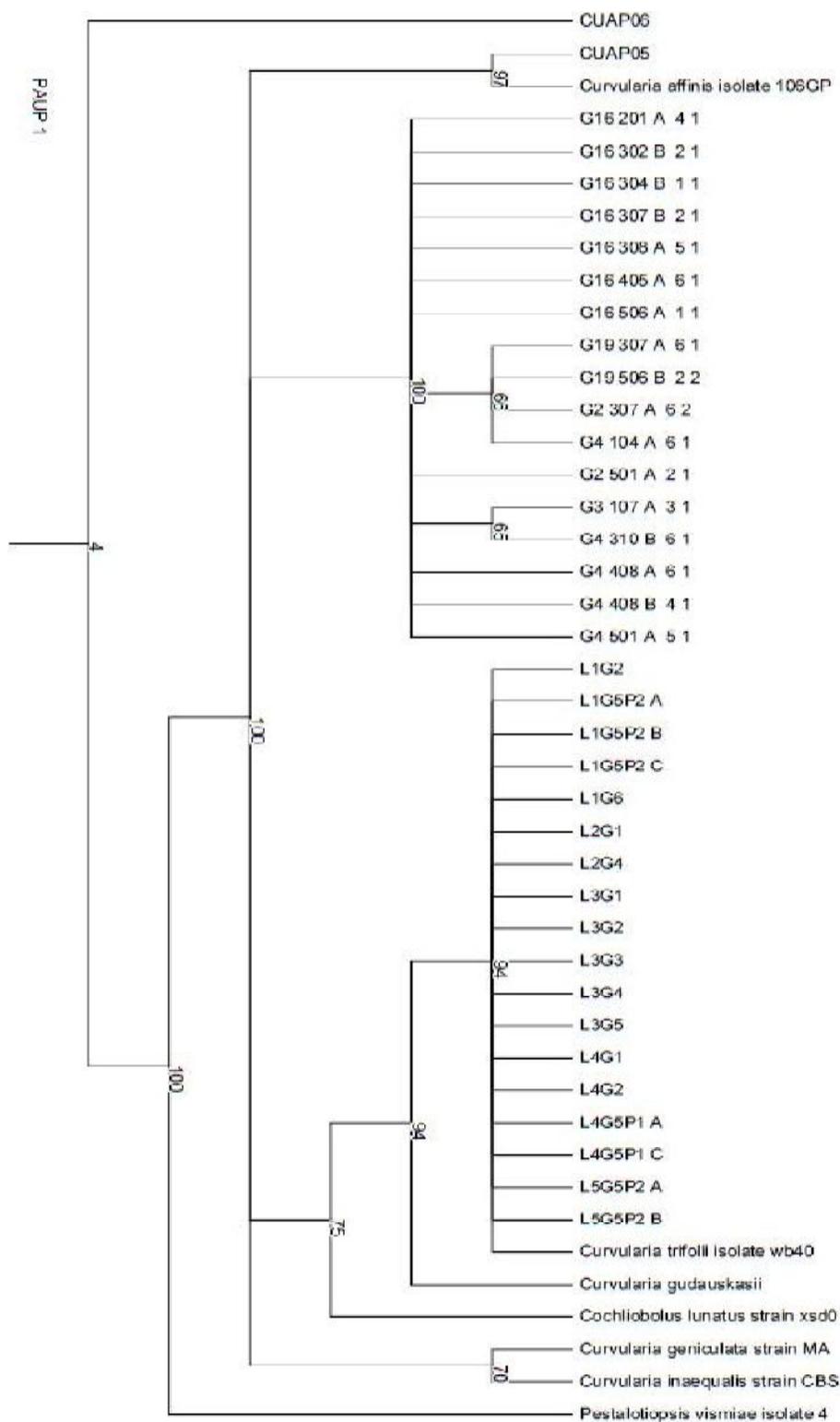


FIGURA 10 - ÁRVORE GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS-5,8S-ITS2 DO rDNA PELO MÉTODO DE PARCIMÔNIA.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Árvore gerada com 250 *bootstraps*. Os valores representados demonstram os índices de consistência dos ramos.

4.3 ANTAGONISMO

Os fungicidas por serem aplicados, em muitos casos, no solo, têm atingido e contaminado águas subterrâneas. Esses e outros problemas têm exigido maior empenho em projetos de controle biológico. Segundo Melo (1998), o controle biológico de fitopatógenos pode ser alcançado utilizando práticas com antagonistas nativos e também por meio da introdução de microrganismos selecionados.

Neste estudo foi realizado o ensaio sobre o potencial antagonista de linhagens de *Curvularia* para avaliar se este teria a capacidade de proteção do milho contra possíveis fitopatógenos.

O potencial antagonista de cinco isolados de *Curvularia* (CUAP05, G3 107-A (3-1), L1G5P2 A, L3G2, L4G5P1 C), escolhidos aleatoriamente, foram avaliados pela técnica de cultura pareada contra os fitopatógenos *Guignardia citricarpa* (PC13/96 e 33/05), *Trichoderma* sp. (CNBP2F16) e contra o fitopatógeno da cultura do café *Fusarium* sp. (151-2).

Os dados de inibição sustentados pelo teste Scott Knot (TABELA 3) foram realizados utilizando o crescimento controle da *Curvularia* como base de comparação.

Os isolados CUAP05 e G3 107-A (3-1) apresentaram inibição contra todos fitopatógenos utilizados no experimento. Nos isolados L1G5P2 A e L3G2 foi constatado inibição de todos os fitopatógenos, excluindo-se o isolado de *Guignardia citricarpa* 33/05, da mesma forma, o isolado L4G5P1 C não inibiu apenas a *G. citricarpa* PC 13/96. Isso provavelmente se deve à falta de dados para uma análise do poder antagonista da *Curvularia* sp. sobre *G. citricarpa* e também pelo lento crescimento da *G. citricarpa* em relação à *Curvularia*. Uma alternativa seria inocular a *G. citricarpa* dias antes da inoculação da *Curvularia* para que a *Guignardia* tivesse tempo de desenvolver. Outra estratégia será, na sequência deste trabalho, utilizar o extrato da cultura de *Curvularia* em meio onde será inoculada a *Guignardia* e avaliar a velocidade de crescimento em comparação com a cultura sem o extrato de *Curvularia*.

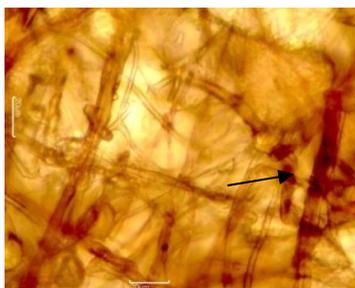
TABELA 3 - TESTE DE ANTAGONISMO DE *Curvularia* sp. CONTRA, *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *G. citricarpa* 33/05 E PC 13/96 EM COMPARAÇÃO AO CRESCIMENTO CONTROLE DE *Curvularia* sp.

Linhagem	Exposição	Média	Desvio Padrão	Scott-Knott 5% ("a" é a maior média)	Impacto no Crescimento
CUAP05	Controle	6,80	0,226	a	---
	<i>G. citricarpa</i> PC 13/96	5,88	0,104	b	Inibição
	<i>Fusarium</i> sp.	5,65	0,240	b	Inibição
	<i>G. citricarpa</i> 33/05	5,89	0,108	b	Inibição
	<i>Trichoderma</i> sp.	4,95	0,240	c	Inibição
Linhagem	Exposição	Média	Desvio Padrão	Scott-Knott 5% ("a" é a maior média)	Impacto no Crescimento
G3 107-1 (3-1)	Controle	7,30	0,209	a	---
	<i>G. citricarpa</i> PC 13/96	6,73	0,115	b	Inibição
	<i>Fusarium</i> sp.	5,85	0,132	c	Inibição
	<i>G. citricarpa</i> 33/05	5,88	0,160	c	Inibição
	<i>Trichoderma</i> sp.	4,77	0,509	d	Inibição
Linhagem	Exposição	Média	Desvio Padrão	Scott-Knott 5% ("a" é a maior média)	Impacto no Crescimento
L1G5P2 A	Controle	7,16	0,192	a	---
	<i>G. citricarpa</i> 33/05	6,96	0,227	a	---
	<i>G. citricarpa</i> PC 13/96	6,12	0,388	b	Inibição
	<i>Trichoderma</i> sp.	5,77	0,115	b	Inibição
	<i>Fusarium</i> sp.	4,97	0,920	c	Inibição
Linhagem	Exposição	Média	Desvio Padrão	Scott-Knott 5% ("a" é a maior média)	Impacto no Crescimento
L3G2	Controle	7,34	0,253	a	---
	<i>G. citricarpa</i> 33/05	7,18	0,307	a	---
	<i>G. citricarpa</i> PC 13/96	6,42	0,179	b	Inibição
	<i>Fusarium</i> sp.	6,03	0,091	c	Inibição
	<i>Trichoderma</i> sp.	5,97	0,125	c	Inibição
Linhagem	Exposição	Média	Desvio Padrão	Scott-Knott 5% ("a" é a maior média)	Impacto no Crescimento
L4G5P1 C	Controle	7,22	0,249	a	---
	<i>G. citricarpa</i> PC 13/96	6,98	0,091	a	---
	<i>Fusarium</i> sp.	5,90	0,414	b	Inibição
	<i>Trichoderma</i> sp.	3,69	0,227	c	Inibição
	<i>G. citricarpa</i> 33/05	2,53	0,375	d	Inibição

FONTE: O Autor (2010).

Curvularia exerceu inibição sobre o fitopatógeno *Trichoderma* sp. CNBP2F16. Este é um potente controlador biológico e age principalmente por parasitismo ou competição (MELO, 1999).

O ensaio de antagonismo foi acompanhado também por microscopia e observou-se, em alguns casos, uma sobreposição de hifas dos isolados de *Curvularia* e das hifas dos fitopatógenos (FIGURA 11). Nestes casos, mesmo ocorrendo inibição dos fitopatógenos, esta não impediu o contato das hifas.

A - CUAP05 x *Fusarium* sp.

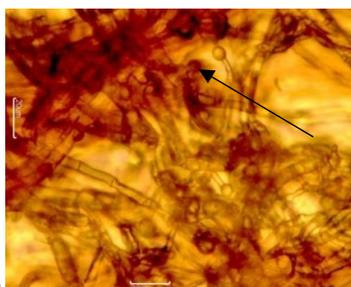
A

B - CUAP05 x *Trichoderma* sp.

B

A - G3 107-A (3-1) x *Fusarium* sp.

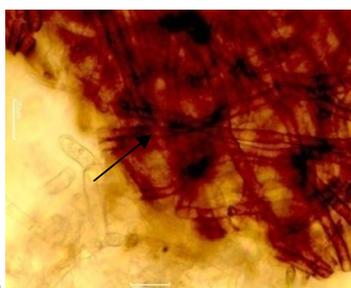
A

B - G3 107-A (3-1) x *Trichoderma* sp.

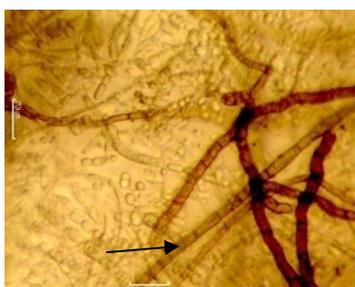
B

A - L1G5P2 A x *Fusarium* sp.

A

B - L1G5P2 A x *Trichoderma* sp.

B

A - L3G2 x *Fusarium* sp.

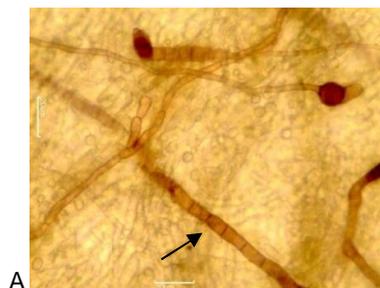
A

B - L3G2 x *Trichoderma* sp.

B

FIGURA 11- DISPOSIÇÃO DAS HIFAS NO TESTE DE ANTAGONISMO DAS LINHAGENS DE *Curvularia* sp. CONTRA FITOPATÓGENOS. (continua)

A - L4G5P1 C x *Fusarium* sp.



B - L4G5P1 C x *Trichoderma* sp.



FIGURA 11 - DISPOSIÇÃO DAS HIFAS NO TESTE DE ANTAGONISMO DAS LINHAGENS DE *Curvularia* sp. CONTRA FITOPATÓGENOS.

FONTE: O Autor (2010).

NOTA: As setas indicam as hifas pertencentes à *Curvularia* sp.

Foi utilizada escala de 20µm.

Observa-se uma sobreposição dos isolados de *Curvularia* e das hifas dos fitopatógenos.

5 CONCLUSÕES

- Outros fungos endofíticos pertencentes ao grupo dos dematiáceos foram isolados do milho, como *Alternaria* sp. e *Bipolaris* sp.
- Isolados de *Curvularia* foram obtidos a partir de plantas sadias de milho (*Zea mays*) e de diferentes genótipos. Quatro parentais e três híbridos descendentes de cruzamentos destes parentais, da região de Campo Largo, PR.
- Foram obtidos 23 isolados de *Curvularia* de três genótipos parentais e três híbridos, sendo o G5 o que forneceu o maior número de isolados (52%). Do parental G7 não foi isolado *Curvularia*. Do híbrido G3 foi obtido apenas um isolado. Esses resultados mostram uma colonização diferenciada para os genótipos de milho testados o que indica um processo co-evolutivo, corroborando o observado por Pamphile e Azevedo (2002).
- A partir da caracterização morfológica foram realizados testes para agrupamento em relação ao tamanho dos conídios e crescimento micelial. Pelo tamanho do conídio foram obtidos quatro agrupamentos nos quais, os isolados de Palotina e Campo Largo estão distribuídos. Os isolados de Curitiba permaneceram no mesmo grupo. Pelo tamanho da colônia os agrupamentos foram diferentes aos 5°, 6° e 7° dias e houve uma distribuição heterogênea dos isolados.
- Foi realizado o sequenciamento das regiões ITS-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal de 37 isolados. Pelo BLAST foi possível averiguar a identidade genética de todos os isolados de Palotina com *Cochiobolus* sp.
- Dezesesseis isolados de Campo Largo apresentaram identidade genética acima de 90% com *Cochiobolus lunatus*, teleomorfo *C.lunata*, espécie patogênica ao homem e animais, e dois com o fitopatógeno *Curvularia trifolii*, com menor identidade.

- A árvore de distância demonstrou que, os isolados de Palotina apresentaram menor variabilidade e ficaram distantes do grupo de Campo Largo que agrupou com uma sequência referência de *Curvularia trifolli*. Próximo a este grupo ainda ficaram *C. gudauskasii* e *C. lunatus*.
- Pela análise da árvore gerada pelo método de Parcimônia, a separação dos grupos de Campo Largo e de Palotina manteve-se. Outros ramos sofreram modificações. Foi possível verificar que por caracterização morfológica os grupos de Campo Largo e Palotina não se separaram enquanto pelos dados do sequenciamento pode-se afirmar que estes pertencem a diferentes espécies, reforçando a importância de metodologia molecular na identificação de endófitos.
- Os isolados CUAP05, G3 107-A (3-1), L1G5P2 A, L3G2, L4G5P1 C de *Curvularia* apresentaram potencial como antagonistas em ensaios de atividade antimicrobiana contra *Guignardia citricarpa* (PC13/96 e 33/05), *Trichoderma* sp. (CNBP2F16) e contra o fitopatógeno da cultura do café *Fusarium* sp. (151-2).

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4ª Ed., Editora Artmed, 1463p. 2004.

ALBORNOZ MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**. v. 9, p. 248-252, 1971.

ALCORN, J. L. On the genera *Cochliobolus* and *Pseudocochliobolus*. **Mycotaxon** 16: 353-379, 1983.

AL DOORY, Y. Chromomycosis in Di Salvo, A.F. Occupational mycoses. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983. p.95-121.

ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais. Viçosa**. Universidade Federal de Viçosa. 1991.

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 467- 470, 2005.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986, cap.6, p. 73-126.

ALVIANO, C.S.; FARBIARZ, S.R. *et al.* Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* Melanin. J. Gen. Microbiol., v.137, p.837-844. 1991

ALVIANO, C. S. & SOUZA, W.; ANGLUSTER, J.; SOARES, R. M. A. Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. **Mycopathologia**, v.132, p.71-77, 1995.

ANTONIOLLI et al., 1998; ANTONIOLLI et al., 2000; GOMES et al., 2002) BRUNS, T.; WHITE, T.; TAYLOR, J. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecological Systematic**, Palo Alto, v. 22, p. 525-564, 1991.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros**. Piracicaba, São Paulo, 1996. 111f. Dissertação de Mestrado, Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archive of Biology and Technology**, v. 43, p. 447- 457, 2000.

ARNOLD, E. A.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **PNAS**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ASSUNCAO, I. P. *et al.* Ocorrência de *Curvularia lunata* em Jurubeba no estado de Alagoas. **Summa phytopathol.** [online]. 2006, vol.32, n.4 [cited 2010-01-17], pp. 386-387 . Available from: <<http://www.scielo.br/scielo.php>

AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular Characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.729-732, 2000.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. **Editora EMBRAPA**, Jaguariúna-SP. p. 117-137, 1998.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROL, G. C.; VAN DER AA, M.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, G. C.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE-BLANCO, C; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic Strains of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Lancaster, v.92, p. 464-477, 2002.

BACON, C. W.; WHITE, J. F. Microbial endophytes. **Marcel Dekker Inc.**, New York, N.Y. 2000.

BALMER, E.; PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, v.2, p.595-634, 1987.

BARBOSA, M. A. G.; REHN, G .K.; MENEZES, M.; LIMA, R.; MARIANO,R. Antagonism of OF *trichoderm species* on *Cladosporium Herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 98-104, 2001.

BAYLES, M.S.H. Chromoblastomycosis clinical tropical medicine and fisiology and diseases. International Practice and Research. **Intropical Ingal Infections**, v.4, n.1, p.45-71, 1989.

BERBEE, M. L., MONA, P. & HUBBARD, S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91: 964-977, 1999.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguaraúna: **Embrapa CNPDA**, , p. 388, 1991.

BILLS, G.; DOMBROWSKY, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes**, v. 2, p. 165-194, 2002.

BIDOCHKA, M. J.; MCDONALD, M. A.; ST. LEGER, R. J. ST.; ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, New York, v. 25, n. 2, p.107-113,1994.

BLANCO, C. ***Guinardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro.** Piracicaba, 1999. 200p. Tese (Doutorado – area de concentração : Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

BULTMAN, T.L.; GANEY, D.T. Induced resistance to fall armyworm (Lepidoptera_Noctuidae) mediated by a fungal endophyte. **Environmental Entomology**, Maryland, v.24, p. 1196-1200, 1995.

BRUNELLI, K.R. ***Cercospora zae-maydis*: Esporulação, Diversidade Morfo-genética e Reação de Linhagens de Milho.** Piracicaba, 2004. 118 p. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / USP.

BRUNS, T.D., WHITE, T.J., E TAYLOR, J.W. (1991) **Annual Review of Ecology and Systematics**, 22: 525-564

CALIGIORNE, R.B.; RESENDE, M.A.; MELILLO, P.H.C.; PELUSO, C.P.; CARMO, F.H.S.; AZEVEDO, V. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. **Medical Mycology**, v. 37. 1999.

CAMARGO ZP, TABORDA DP. Antigenic relationship between *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from farces of a penguin and a human isolate of *P. brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 31, p.347-52, 1993.

CARMO, E.S., BELÉM, L.F., RAISSA CATÃO, M.R., LIMA, E.O., SILVEIRA, LOPES, I., SOARES, L.H.M. (2007). Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande – PB. **RBAC**, 39: 213-216.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E.; Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

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

CARVALHO, R.P.L. **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo.** Piracicaba, 1970. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / USP.

CARTER, E. & BOUDREAUX, C. Fatal cerebral phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient. **J. Clin. Microbiol.** 42: 5419-5423, 2004.

CHERRY, A.J.; LOMER, C.J.; DJEGUI, D.; SCHULTHESS, F. Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa. **Biocontrol**, San Diego, v.44, n.3, p.301-327, 1999.

CHUNG, W. H. A new species of *Curvularia* from Japan. **Mycotaxon** 91: 49-54, 2005.

CIMMYT. Disponível em: < <http://www.cimmyt.org/> > Acesso em: 08/2009.

CLAY, K.; HARDY, T.N.; HAMMOND Jr, A.M. Fungal endophytes of *Cyperus* and their effect on the insect herbivory. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.72, p.1284-1289, 1985.

CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia**, Berlin, v.73, p.358-362, 1987.

CLAY, K. Fungi and the food of the goods. **Nature**, v. 427, p. 401-402, 2004.

COHEN, S., V. ALLASIA, P. VENARD, S. NOTTER, C.VERNIRE, AND F. PANABIÉRES, F. 2003. Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in Eastern Corsica. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:791-805.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO
<http://www.conab.gov.br/conabweb/> . Acesso em 21/11/2009

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: **The American Phytopathological Society**, , p. 539,1993.

CORBETTA, G. Rassegna del specie del genere *Curvularia*. *Riso* 4: 3-23, 1964.

CRUZ, I.; OLIVEIRA, M.L.C.; VASCONCELOS, C.A.; OLIVEIRA, A.C. Efeito no nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Itabuna, v.25, p.293-297, 1996.

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA, 5, **Cursos para agricultores**, IAC, Campinas, São Paulo, p.27-56, 1999.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C.A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v. 44, 1999.

CRUZ, I.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. **Cultivo do milho. Pragas da fase vegetativa e reprodutiva**. Relatório técnico, Embrapa, Sete Lagoas, MG, 2002.

DALZOTO, P.R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. RAPD analysis of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.9, p. 1069-1074, 2003.

DASGUPTA, S.; SAHA, D.; SAHA, A. Levels of common antigens in determining pathogenicity of *Curvularia eragrostidis* in different tea varieties. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v.98, n.5, p.1084-1092, 2005.

DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; EZRA, D., CASTILLO, U.; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Muscodor vitigenus*, sp. nov., an endophyte from *Paullinia*. **Mycotaxon**, v. 84, p. 39-50, 2002a.

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

DE HOOG, G.S.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. **Mycoses**, v.41, p. 183-189, 1998.

DE HOOG, GS; VICENTE, V.; CALIGIORNE, R.B; KANTARGLIOCU, S.; TINTELNOT, K.; GERRITS VAN DEN ENDE AHG; HAASE, G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v.41, p.4767-4778, 2003.

DE MARCO, J. L.; IGLIS-VALADARES, M. C.; FELIX, R. C. Production of hidrolitic enzymes by *Trichoderma* with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of Witches' Broom Disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 33-38, 2003.

DE WET, J.; SLIPPERS, B.; PRELSIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.46, n.1, p.116-126, 2008.

DIXON, D.M.; POLAK-WISS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification, **Mycoses**, v.34, p.1-18, 1991.

DREYFFUS, M. M.; CHAPPELLA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In V. P. Gullo (ed.), *The discovery of natural products with therapeutic potential*. **Butterworth-Heinemann, London, United Kingdom**, p. 49-80, 1994.

DUARTE, J. de O. **Economia da produção**. In: CRUZ, J.C. (Ed.). *Cultivo do milho*. 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Embrapa Milho e Sorgo. *Sistemas de produção*). Disponível em: <
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/economia.htm> Acesso em :01/2010

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

ELLIS, M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. England. Commonwealth Mycological Institute, 1971.

EMBRAPA. Disponível em:< <http://www.embrapa.br/>>. Acesso em 12/09

ERNEST, M.; MENDGEN, W. K.; WIRSEL, W. Endophytic Fungal Mutualists: Seed-Borne *Stagonospora* spp.. Enhance reed biomass production in axenic microosms. **Molecular Plant-Microbe Interations**, v. 16, n. 7, p. 580-587, 2003.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: **Edusc**, 510p, 2004.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; FRACCHIOLLA, M.; ZONNO, M.C.; MOTTA, A. Drazepinone, a trisubstituted tetrahydronaphthofuroazepinone with herbicidal activity produced by *Drechslera siccons*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.66, n.6, p. 715-721, 2005.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; VURRO, M.; FRACCHIOLLA, M.; CHARUDATTAN, R. Herbicidal potencial of ophiobolins produced by *Drechslera gigantea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v.54, n.5, p. 1779-1783, 2006.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, n.3, p.175-85, 1998.

FAO. FAOSTAT Data 2009. Disponível em : <http://faostat.fao.org/faostat>. Acesso em janeiro.2009

FARR, D. F.; CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y., Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. **Mycologia**, v. 94, n. 3, p. 494-504, 2002.

FEGAN, M.; MANNERS, J. M; MACLEAN, D. J.; IRWIN; J. A. G.; SAMUELS, D. HOLDOM, G. AND LI, D. P. Random amplified polymorphic DNA marks reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **J. Gen. Microbiol.** V.139, p. 2075–2081,1993.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Segunda edição. Brasília: Embrapa. Cenargem. 1995.

FENG, B.; HU, W.; MA, B.; WANG, Y.; HUANG, H. Purification, characterization, and substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin-rhamnosidase activity from *Curvularia lunata*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.76,p. 1329–1338, 2007.

FIGUEIREDO, J. G. **Bioprospecção, Caracterização Morfológica e Molecular de Endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com Ênfase EM *Pestalotiopsis* spp..** Curitiba, 2006. Dissertação de Mestrado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FIGUEIREDO, J. ; PIMENTEL, I. C.; VICENTE, V. A.; PIE, M. ; KAVA-CORDEIRO, V. ; GALLITERASAWA, L. V.; PEREIRA, J. O. ; SOUZA, A. L. ; GLIENKE, C. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp.. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1123-1132, 2007.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, p. 299-305, 1992.

FRYEN, A. *et al.* Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris* (*Drecheslera*) *hawaiiensis*. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v.256, n. 7, p. 330-334. 1999.

GEIS, P.A.; SZANISZLO, P.J. Carotenoid pigments of the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. **Mycologia** 76, 268-273, 1984.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995. 115 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, n.2, p.251-255, 2002.

GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A.; KUMAR, V.; KHARWAR, R.N. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correa (Rutaceae) from Varanasi (India). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Norwell, v.23, n.10, p.1371-1375, 2007.

GRAZVINI, H.; TEKAUZ, A. Host-pathogen interactions among barley genotypes and *Bipolaris sorokiniana* isolates. **Plant Disease**, Saint Paul, v.92, n.2, p.225-233, 2008.

GROSE E, TAMSITT JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**. v. 4(2). p.124-5, 1965.

GUERIM, H. *Exophiala spinifera*: Polissacarídeos de Parede Celular, Exopolissacarídeos e Antígenos. 93p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers: a systems for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 82, p. 832-835, 1992.

HAASE, G.; SONNTORG, L.; MELXER-CRICK, B.; HOOG, G.S. de Phylogenetic inference by SSU-gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. **Studies in Mycology**, n.43: 80-97, 1999.

HERRÁEZ P., REES C., DUNSTAN R. **Invasive Phaeohyphomycosis Caused by *Curvularia* Species in a Dog** *Vet Pathol* 2001 38: 456 DOI: 10.1354/vp.38-4-456

HERRERO, N.; MÁRQUEZ, S. S.; Mycoviruses are common among different species of endophytic fungi of grasses. **Arch Virol**, New York, v.154, p. 327–330, January 2009.

- HOOG, G.S.de; HAASE, G. Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.64, p.17-26, 1993.
- HOOG, G.S. de; The black yeasts: possible adaptation to the human host. **Studies in Mycology**, v.19, p.1-36, 1979.
- HOOG, G.S. de; GUARRO. **Atlas of clinical fungi**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995, 720p.
- HOOG, G.S. de. Evolution of Black yeast: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.63, p.105-109, 1993.
- HOOG, G.S.; GUARRO, J. GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas of clinical fungi **Realization Computer Science II** University of Wurzburg, Germany Atlas version 2004.
- HOSOKAWA, M., TANAKA, C. & TSUDA, M. Conidium morphology of *Curvularia geniculata* and allied species. *Mycoscience* 44: 227-237, 2003.
- IBGE.Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br> > Acesso em 12/2009.
- INTERNATIONAL MAIZE AND WHEAT IMPROVEMENT CENTER (CIMMYT). Disponível em: <http://www.cimmyt.org/>. Acesso em:02/07/2009
- JACOBSON, E.S, HOVE, E., EMERY, H.S. Antioxidant function of melanin in black fungi. **Infect Immun**, v.63, n.12, p.4944-45. 1995.
- JONES, K.D. **Aspects of the Biology and Biological Control of the European Corn Borer in North Carolina**. Raleigh, 1994. 127 p. PhD. Dissertation - North Carolina State University.
- JOHNSON WD, LANG CM. Paracoccidioidomycosis (South American blatomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Veterinary Pathology**. v.14, p.368-71, 1977.
- KERN, ME, BLEVINS, KS. Micologia médica: texto & atlas. 2.ed. *São Paulo: Premier*, 1999.
- KHACHATOURIANS, G.G. Production and use of biological pest control agents. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.4, p.120-124, 1986.
- LATCH, C. G. M.; CHRISTENSEN, M. J. Artificial infection of grasse with endophytes. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.107, p.17-24, 1985.
- LEE, Y. H.; SNOW J. P. Phenotypic and genetic variations in *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, the soybean stem canker pathogen. **Phytopathology**, v. 81, p.1205.1992.
- LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZAHO, Z. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1515–1519, 2005.

- LI, J. Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; TOMBE, B. O.; BASHYAL, B.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp.. And *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, v. 56(5), p. 463-468, 2001.
- LI, J. Y.; STROBEL, G. A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 261-265, 2001.
- LIMA, A. & FURTADO, M. *Curvularia* species (anamorphic fungi: Hyphomycetes) from Santiago island, Cape Vert. *Portugaliae Acta Biol.* **22**: 145-156, 2007.
- LINHARES, A. I.; MATSUMURA, A. T. S.; LUZ, V. C. Amplitude de ação antagonista de microrganismos epífitas do trigo sobre o crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 1, n. 3, p. 119-126, 1995.
- LU, H; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New Bioactive Metabolites Produced by *Colletotrichum* sp., an Endophytic Fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67-73, 2000.
- DRESCH, L. F. Doença mancha de curvularia presente no trevo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Agronomia, Departamento de Fitossanidade, 2003.
- MADDISON, W. P. AND D.R. MADDISON. 2009. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Versão 2.72. Disponível em <<http://mesquiteproject.org>>.
- MAITAN, V.R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. Goiânia, 1998. 122f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. I, p. 369-409, 1993.
- MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp.. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Science agriculture**.v. 55, n. 1, 1998.
- MATZENUER, R. *et al.* Evapotranspiração da cultura do milho. II – Relações com a evaporação do Tanque Classe “A”, com evapotranspiração de referência e com radiação solar global, em três épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.6, n.1, p. 15-21, 1998.
- MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: **Controle biológico**. v. I. MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. (Eds.) Jaguariúna, SP, Embrapa-CNPMA. 1998. 264p.
- MESSIAS, C. L., Fungos, sua utilização para o controle de insetos de importância médica e agrícola. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.84, n.III, p.57-59, 1989.

MICHELMORE, R. W. and S. H. HULBERT. Molecular markers for the genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 25:383-404, 1987.

MISHRA, K.; MISHRA, A. KEHRI, HK.; SHARMA, B.; PANDEY, A. K. Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, India, v.8, 2009.

MONTEALEGRE, J. R.; REYES, R.; PÉREZ, L. M.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.6, 2003.

MOURA, R. M.; PEDREGOSA, E.M.R.; GUIMAREAS, L.M.P. Novos dados sobre a etiologia da casca preta do inhame no nordeste do Brasil. **Nematologia Brasileira**. V.25, n.2, p.235-237, 2001.

OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F.T.; CASELA, C.A.; PINTO, N.F.J.A.; FERREIRA, A.S. Diagnose e controle de doenças na cultura do milho. p.227-267 In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. eds. **Tecnologias de produção do Milho**. Viçosa: UFV, p. 366, 2004.

Pamphile, J.A.; Azevedo, J.L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays* L). *World J Microbiol Biotechnol* 18:391–39, 2002.

PANACCIONE, D. G.; JOHSON, R. D.; WANG, J.; YOUNG, C. A.; DAMRONGKOLL, P.; SCOTT, B.; SCHARDT, C. L. Elimination of ergovaline from a grass *Neothymophodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 98, p. 12820- 12825, 2001.

PANDEY, A.K.; REDDY, M.S.; SURYANARAYANAN, T.S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWA, J.; HIRANO, S.S. (Ed). **Microbial Ecology of Leaves**. Sping Verlag, 1991, p.179-197.

PEREIRA, J. O. **Fungos endofíticos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendesh***. Piracicaba, 1993. 105 p. Tese de Doutorado - Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PEREIRA, J. O; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. **Micologia**, v.85, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. p. 538-555. In: **Manual de Fitopatologia**. KIMATI, H.; AMORIN; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. São Paulo: Agronômica Ceres, 774p., 1997.

- PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J. HEUVEL, J. VAN DEN (Ed), **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge University Press, 1986, p. 175-87.
- PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDRENA, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.179-197.
- PIMENTEL, I. C.; AZEVEDO, João Lucio de (Orient.). Fungos, endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas . 153 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, 2001.
- PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A. M.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos do Milho (*Zea mays* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas. In **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001a, p. 24.
- PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L.; Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L) Merrill) under different environmental conditions. Braz. arch. biol. technol;49(5):705-711, Sept. 2006
- PIMENTEL, J., MAHADEVAN, K., WOODGYER, A., SIGLER, L., GIBAS, C., HARRIS, O., LUPINO, M. & ATHAN, E. (2005). Peritonitis due to *Curvularia inaequalis* in an elderly patient. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4288-4292.
- PHONGPAICHIT S, ONGSAKUL M, NILRAT L, THARAVICHITKUL P; BUNCHOO S, CHUAPRAPAISILP T, WIRIYACHITRA P. 1994. Antibacterial activities of extracts from *Garcinia mangostana pericarps* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. Songklanakarin **Journal of Science and Technology** 16(4):399-405.
- PHONGPAICHIT, S.; NIKOM, J.; RUNGJINDAMAI, N.; SAKAYAROI, J.; HUTADILOK, T.N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; KIRTIKARA, K. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.51, n.3, p. 517-525, 2007.
- POHL M.E.D.; PIPERNO D.R.; POPE K.O.; JONES J.G. Microfossil evidence for pre-Columbian maize dispersals in the neotropics from San Andre´ s, Tabasco, Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6870–6875, 2007.
- POITEVIN, C.G.; VALASKI, J. ; MARANGONI, P. R. D. ; BOZZA, A. ; GABARDO, J. ; PIMENTEL, I. C.; DALZOTO, P. R. *Curvularia* sp ISOLATED FROM DIFFERENT VARIETIES OF CORN (*Zea mays* L.) IN STATE OF PARANÁ, BRAZIL. In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009, Rio Claro. Holos Environment, 2009. v. 9. p. 41.
- POLAK, A. Melanin as a Virulence Factor in Pathogenic Fungi. **Mycoses**: v.33, n.5, p.215-224. 1990.

POSADA, F.J.; VEGA, F.E.; REHNER, S.A. *Beauveria* as a possible coffee endophyte. **Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, Burlington, Vermont, July 26-31, p.47, 2003.

POSTERARO, B.; SCARANO, E.; LA SORDA, M.; TORELLI, R.; DE CORSO, E.; MULE, A.; PALUDETTI, G.; FADDA, G.; SANGUINETTI, M. Eosinophilic fungal rhinosinusitis due to the unusual pathogen *Curvularia inaequalis*. *Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*, Italy, v.51, Jan. 2009.

QUESADA-MORAGA, E.; LANDA, B.B.; MUÑOS-LEDESMA, J.; JIMÉNEZ-DIÁZ, R.M.; SANTIAGO-ÁLVARES, C. Endophytic colonization of opium poppy, *papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.161, p. 323-329, 2006.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p.89-96, 2001.

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

REHNER, S. A., UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botanic**, v. 72. p.1666-1674, 1994.

RESTREPO, A., J.G. MCEWEN, AND E. CASTAÑEDA. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle. **Med. Mycol.** v. 39, p. 233-241, 2001.

REVANKAR, S.G. Dematiaceous fungi. **Mycoses**, München, v.50, n.2, p. 91-101, 2007.

RIBEIRO, L. A. de **Variabilidade Genética por RAPD em fungos endófitos de Gênero *Penicillium*, provenientes de *Zea mays* L.** Curitiba, 1995. 90 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. (1993). *Fungal infection: diagnosis and management*. Blackwell Scientific Publications. 192-195.

RODRIGUES, K. F.; DIAS-FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, p. 905-909, 1996.

RODRIGUES, K.F.; SIEBER, T.N.; GRUNIG, C. R. ; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences, **Mycological Research**, Cambridge, v.108, p.45-52, 2004.

ROSEWICH, U.L.; McDONALD, B.A. DNA fingerprinting in fungi. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.41-48, 1994.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biology Science**, v. 1, p. 24-33, 2005.

SAIKKONEM, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: A continuum of interaction with Host Plants. **Annual Reviews ecology Systematic**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.37-67, 1995.

SAN-BLAS, G., AND G. NIÑO-VEGA. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In R.L. Cihlar and R.A. Calderone (eds.), Fungal pathogenesis: principles and clinical applications, Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. p. 205-266, 2001.

SARTORI, D. **Marcadores moleculares para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A em grãos de café.** 2005. 97 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

SCHNITZLER, N. *et al.* Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala* (*Wangiella*) dermatitidis on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. **Infect Immun.**, v.67, p. 94-101. 1999.

SCHUTZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Cambridge University Press**, v. 106, p. 996-1004, 2002.

SHALINI, N.; LATA, K. L.; KOTASTHANE, A. S. Genetic relatedness among *Trichoderma* isolates inhibiting a pathogenic fungi *Rhizoctonia solani*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 508-584, 2006.

SHAN, F.Y.; WEI, S.W.; JIE, L.Y.;ZHANG, J.C.; GAO, D.J. Parasitic fitness and RAPD analysis of *Curvularia* species on corn. **Journal of Agricultural University of Hebei**, Hebei, v.31, n.1, p. 37-41, 2008.

SHIVAS, R. G.; ALLEN, J. G.; WILLIAMSON, P. M. Intraspecific variation demonstrated in *Phomopsis leptostromiformis* using cultural and biochemical techniques. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 320-323, 1991.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 171-190.

SILVA, F. de A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assisat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais.Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

SILVA-VERGARA ML, MARTINEZ R, CHADU A, MADEIRA M, SILVA GF, MAFFEI CML. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**. v. 36, p. 37-42, 1998.

SILVA-VERGARA ML, MARTINEZ R, CAMARGO ZP, MALTA MH, MAFFEI CM, CHADU JB, Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**. v. 38 (3), p. 193-9, 2000.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158: 1-261, 1987.

SIVANESAN, A., JOHN, L., ALCORN, J. & SHIVAS, R.. Three new graminicolous species of *Curvularia* (anamorphic fungi) from Queensland, *Aust. Syst. Bot.* 16: 275-278, 2003.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; *et al.* Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.

SOUZA, L. P.; ASTOLFI F. S.; PEREIRA, J.O. Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais. **Resumos da 7ª Reunião Especial da SBPC**. Manaus-AM, 2001.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; SPARTACO, A. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonic**.v. 34, n.2 , p. 185 195, Manaus, 2004.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. *Urban*). **Ciência Tecnológica de Alimentos**.v. 18, p. 382-385, 1998.

STRINGARI, D.; GLIENKE, C.; FIGURA, G. Variabilidade genética e morfológica de isolados do fungo *Guignardia* spp.. procedentes de diversas regiões e hospedeiros. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 24., 2004, Gramada.**Anais Gramado**, 2004. p. 218

STRINGARY, D. Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de *Guignardia* spp.. E *Phyllosticta* sp. nos Estados do Paraná e São Paulo. p93. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

STROBEL, G. A.; LI, J. Y. ; WORAPONG, J. ; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Pestalotiopsis jesterri*, sp. Nov. an endophyte from *Fraea bodenii* from the Southern Highlands of Papua New Guinea. **Mycotacon**, v. 76, p. 257-266, 2000a.

STROBEL, G. A.; METZ, A. M.; HADDAD, A.; WORAPONG J.; LONG, D.M.; FORD, E. J.; HESS, W. M. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. **Microbiology**, v 146, p. 2079-2089, 2000b.

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

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Review Biotechnologic**, v. 22, p. 315–333, 2002.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infection**, v. 5, p.535–544, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. H. Biosprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhodocline parkeri* on Douglas-fir with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p.45-54, 1988.

SUN, G., OIDE, S., TANAKA, E., SHIMIZU, K., TANAKA, C. & TSUDA, M. Species separation in *Curvularia* "geniculata" group inferred from *Brn1* gene sequences. *Mycoscience* 44: 239-244, 2003.

SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Versão 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M; KUMAR S. **MEGA4**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599, 2007.

TAYLOR, B.E., WHERLER, M.H., SZANISZLO, P.J. Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. **Mycology** 79, 320-322, 1987.

TERASAWA JUNIOR, F.; KOEHLER, H. S. **Implicações da interação genótipo - ambiente no melhoramento do milho no estado do Paraná** . xvii, 125f. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Defesa: Curitiba, 2006, 2006.

TSUDA, M. & UEYAMA A. *Pseudocochliobolus verruculosus* and variability of conidium morphology. *Mycologia* 74: 563-568,1982.

UVP Bio-Imaging Systems (2003). Labworks v4.6 Image Acquisition and analysis software. Upland, EUA.

VAN DER AA, H. A., M. E. Noordeloos, and J. de Gruy-ter. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. **Studies in Mycology**, v. 32, p. 3-19. 1990.

VERONESI R. Blastomicose Sul Americana (Paracoccidioidomicose). **Tratado de Infectologia**. Editora Atheneu, São Paulo, Brasil, p. 1081-11, 1996.

VELICHETI, R. K.; McCCLARY, C.; LAMISON, R. D.; SINCLAIR, J. B. Immunodetection of the *Diaporthe* and *Phomopsis* complex of soybeans. **Phytopathology**, v. 81, p. 1212, 1991.

VIDIC, M. Variability in *Diaporthe phaseolorum* var *caulivora* on soybean in the Vojvodina Providence in Serbia. **Zastita Bilja**, v. 42, p. 183-189, 1991.

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

WANG, J.; Li, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology. Letters**, v. 193, p. 249-253, 2000.

WHELISH, J.; McCLELLAND, M. *Fingerprinting* genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p.7213-7218, 1990.

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

WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G. ; MORROW, A.C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agriculture Ecosystem & Environment**, v. 44, p.13-37, 1995.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A .R.; LIVAK, K.J.; RAFOLSKI, J.A ; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzimology**, New York, v.218, p.704-740, 1993.

ZANON, U. E NEVES, J. (1997). *Infecções Hospitalares – Prevenção, Diagnóstico e Tratamento*. Rio de Janeiro: MEDSI.

ZHANG, A. W.; RICCIONI, L.; PEDERSEN, W. L.; KOLLIPARA, K. P.; HARTMAN, G. L. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. **Phytopathology**. v. 88, p.1306 -1314, 1998.

ZHANG-MENG & ZHANG-TIAN, Y. A new species of *Curvularia* from China. *Mycosystema* 22: 357-358, 2003.

ZHANG-MENG, ZHANG-TIAN, Y. & WU-YUE, M. A new name and a new variety in *Curvularia*. *Mycosystema* 23: 177-178, 2004.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1529- 1530, 2000.

ZOU, W. X.; TAN, R. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **NPR**, v.18, p. 448-459, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE 1- MATRIZ BINÁRIA UTILIZADA PARA A MONTAGEM DA ÁRVORE DE PARCIMÔNIA

	Reverso Preto	Bordos da colônia	Esporulação	Micélio	Micélio sob Meio	Micélio Preto	Micélio verde musgo	Micélio cinza
CUAP05	1	0	1	0	0	0	0	1
CUAP06	1	1	1	1	0	0	0	1
G14 203 - B (6-1)	0	0	1	0	0	0	0	1
G16 201 - A (4-1)	1	1	1	1	0	0	0	1
G16 302 -B (2-1)	1	0	1	1	0	0	0	1
G16 308 -A (5-1)	1	0	1	1	0	1	0	0
G16 405 - A (6-1)	1	0	1	1	0	1	0	0
G16 506 - A (1-1)	1	0	1	0	0	0	0	1
G19 107 - A (4-1)	1	0	1	1	0	0	1	0
G19 304 - B (1-1)	1	0	1	1	0	0	1	0
G19 307 - A (6-1)	1	0	1	1	0	1	0	0
G19 307 - B (2-1)	1	0	1	0	0	1	0	0
G19 403 - B (5-1)	1	0	1	1	0	0	0	1
G19 506 - B (2-2)	1	0	1	1	0	0	0	1
G2 307 -A (6-2)	1	1	1	1	0	0	0	1
G2 501 - A (2-1)	1	0	1	1	0	1	0	0
G3 107 - A (3-1)	1	0	1	1	0	1	0	0
G4 104 - A (6-1)	1	0	1	1	0	0	0	1
G4 208 - A (5-1)	1	0	1	1	0	0	0	1
G4 308 - B (2-1)	1	0	1	1	0	0	0	1
G4 310 - B (6-1)	1	0	1	1	0	1	0	0
G4 408 - A (6-1)	1	1	1	1	0	1	0	0
G4 408 - B (4-1)	1	0	1	1	0	0	0	1
G4 501 - A (5-1)	1	0	1	1	0	1	0	0
L1G2	1	0	1	1	0	1	0	0
L1G5P1 A	1	0	1	1	0	0	0	1
L1G5P2 B	1	0	1	1	0	1	0	0
L1G5P2 C	1	0	1	1	0	1	0	0
L1G6	1	0	1	1	0	1	0	0
L2G1	1	0	1	1	0	1	0	0
L2G4	1	0	1	1	0	1	0	0
L2G5	1	0	1	1	0	1	0	0
L2G5P1	1	0	1	1	0	0	1	0
L3G1	1	0	1	1	0	1	0	0
L3G2	1	0	1	1	0	1	0	0
L3G3	1	0	1	1	0	1	0	0
L3G4	1	0	1	1	0	1	0	0
L3G5	1	0	1	1	0	1	0	0
L3G6	1	0	1	1	0	1	0	0
L4G1	1	0	1	1	0	1	0	0
L4G2	1	0	1	1	0	1	0	0
L4G5P1 A	1	0	1	1	0	1	0	0
L4G5P1 B	1	0	1	1	0	1	0	0
L4G5P1 C	1	0	1	1	0	0	1	0
L5G5P2 A	1	0	1	1	0	1	0	0
L5G5P2 B	1	0	1	1	0	1	0	0
L5G5P2 C	1	0	1	1	0	1	0	0

Reverso preto	Ausência 0	Presença 1
Bordos da colônia	Regular 0	Irregular 1
Esporulação (BDA)	Ausência 0	Presença 1
Micélio	Cotonoso 0	Ralo 1
Micélio sob Meio	Ausência 0	Presença 1
Micélio preto	Ausência 0	Presença 1
Micélio verde musgo	Ausência 0	Presença 1
Micélio cinza	Ausência 0	Presença 1

APÊNDICE 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TAMANHO DO ESPORO

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados Exporos Eixo Maior.txt

Data 19/01/2010 Hora 12:47:17

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	46	130601.39744	2839.16081	7.9217 **
Resíduo	893	320052.23309	358.40116	
Total	939	450653.63053		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 46, 893 F-krit(1%) = 1.5714 F = 7.9217 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados Exporos Eixo Menor.txt

Data 19/01/2010 Hora 12:48:08

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	46	30083.83874	653.99649	9.3106 **
Resíduo	893	62725.95398	70.24183	
Total	939	92809.79273		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 46, 893 F-krit(1%) = 1.5714 F = 9.3106 $p < .00100$

APÊNDICE 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO CRESCIMENTO MICELIAL

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

Arquivo Crescimento Dia 5 Scott-Knott p5%.txt

Data 25/08/2009 Hora 18:13:42

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	46	408.29446	8.87597	32.0189 **
Resíduo	188	52.11548	0.27721	
Total	234	460.40994		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 46, 188 F-krit(1%) = 1.6593 F = 32.0189 $p < .00100$

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

Arquivo Crescimento Dia 6 Scott-Knott.txt

Data 25/08/2009 Hora 18:15:09

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	46	423.30585	9.20230	30.7097 **
Resíduo	188	56.33500	0.29965	
Total	234	479.64085		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 46, 188F-krit(1%) = 1.6593 F = 30.7097 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Crescimento Dia 7 Scott-Knott

Data 25/08/2009 Hora 18:16:10

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	46	418.68881	9.10193	39.4787 **
Resíduo	188	43.34400	0.23055	
Total	234	462.03281		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 46, 188 F-krit(1%) = 1.6593 F = 39.4787 $p < .00100$

APÊNDICE 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TESTE DE ANTAGONISMO

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

Arquivo Resultados CUAP05.txt Data 19/01/2010 Hora 16:49:27

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	8.76860	2.19215	58.0702 **
Resíduo	20	0.75500	0.03775	
Total	24	9.52360		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 4, 20 F-krit(1%) = 4.4307 F = 58.0702 $p < .00100$

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

Arquivo Resultados Guignardia citricarpa 33.05.txt

Data 19/01/2010 Hora 16:46:22

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	5	110.31900	22.06380	231.3374 **
Resíduo	24	2.28900	0.09537	
Total	29	112.60800		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 5, 24 F-krit(1%) = 3.8951 F = 231.3374 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados L3G2.txt Data 19/01/2010 Hora 16:51:20

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO
 QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	8.18740	2.04685	47.6566 **
Resíduo	20	0.85900	0.04295	
Total	24	9.04640		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 4, 20 F-krit(1%) = 4.4307 F = 47.6566 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados Fusarium.txt Data 19/01/2010 Hora 16:47:58

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO
 QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	5	7.78142	1.55628	10.2640 **
Resíduo	24	3.63900	0.15162	
Total	29	11.42042		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 = p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 5, 24 F-krit(1%) = 3.8951 F = 10.264 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados Guignardia citricarpa PC13.96.txt

Data 19/01/2010 Hora 16:47:01

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	5	102.43542	20.48708	150.4559 **
Resíduo	24	3.26800	0.13617	
Total	29	105.70342		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 5, 24 F-krit(1%) = 3.8951 F = 150.4559 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados L4G5P1 C.txt Data 19/01/2010 Hora 16:52:04

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	85.63660	21.40915	246.6492 **
Resíduo	20	1.73600	0.08680	
Total	24	87.37260		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 4, 20 F-krit(1%) = 4.4307 F = 246.6492 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados G3 107-1 (3-1).txt

Data 19/01/2010 Hora 16:50:05

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	18.58260	4.64565	64.5678 **
Resíduo	20	1.43900	0.07195	
Total	24	20.02160		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 4, 20 F-krit(1%) = 4.4307 F = 64.5678 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados L1G5P2 A.txt Data 19/01/2010 Hora 16:50:40

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	4	16.01660	4.00415	18.2090 **
Resíduo	20	4.39800	0.21990	
Total	24	20.41460		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 4, 20 F-krit(1%) = 4.4307 F = 18.209 $p < .00100$

=====

ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.30/05/2009

=====

Arquivo Resultados Trichoderma.txt

Data 19/01/2010 Hora 16:48:40

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	5	34.96275	6.99255	21.6181 **
Resíduo	24	7.76300	0.32346	
Total	29	42.72575		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

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

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL: 5, 24 F-krit(1%) = 3.8951 F = 21.6181 $p < .00100$

ANEXOS

ANEXO 1- ANÁLISE DO SOLO ONDE FOI REALIZADO O EXPERIMENTO A CAMPO. (continua)

LABORATÓRIO DE ANÁLISES

Lygia Terasawa


fundação abc
 FUNDAÇÃO ABC PARA ASSISTÊNCIA E
 DIVULGAÇÃO TÉCNICA AGROPECUÁRIA



Solicitante: Vania Portes Kulka
 Propriedade: Não Informada

Debitar: Particular
 Data de emissão: 18/11/2009
 Material analisado: Solo

NÚMERO DO LABORATÓRIO		IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	
20158	1		



DETERMINAÇÕES			AMOSTRAS	
			20158	
P	Fósforo	mg/dm ³	41	
M.O.	Mat. Orgânica	g/dm ³	60,51	
pH	pH		4,4	
H+Al	H+Al	mmolc/dm ³	147	
Al	Alumínio	mmolc/dm ³	21,5	
K	Potássio	mmolc/dm ³	1,6	
Ca	Cálcio	mmolc/dm ³	85	
Mg	Magnésio	mmolc/dm ³	37	
S.B.	Soma de Bases	mmolc/dm ³	123,8	
C.T.C.	Cap. Troca Cat.	mmolc/dm ³	270,3	
V%	Sat. de Bases	%	46	
%Al CTC	Sat. por Al	%	14,8	
ARGILA	ARGILA	g/kg	510	
SILTE	SILTE	g/kg	391	
AREIA	AREIA	g/kg	99	
CF	Classif. Física		Tipo 03	

Extratores: P,K,Ca,Mg Resina; M.O.: Na2Cr2O7; pH: Sol. CaCl2; H+Al: Tampão SMP; Al: KCl

Responsável: Coordenador Ademir Pedroso de Oliveira C.R.Q.:09902540


 ASSINATURA

Rodovia PR 151, Km 288 - TeleFax: (42) 3232-2662 - Cx. Postal 1003 - CEP 84166-990 - Castro - Paraná - Brasil - CNPJ 78.594.025/0001-58 - Insc. Estadual: 90123853-71
 E-mail: fabc@fundacaoabc.org.br / Site: www.fundacaoabc.org.br

ANEXO 1 - ANÁLISE DO SOLO ONDE FOI REALIZADO O EXPERIMENTO A CAMPO.

LABORATÓRIO DE ANÁLISES

Lygia Terasawa



fundação abc
FUNDAÇÃO ABC PARA ASSISTÊNCIA E DIVULGAÇÃO TÉCNICA AGROPECUÁRIA



Solicitante: **Vania Portes Kulka**
Propriedade: **Não Informada**

Debitar: **Particular**
Data de emissão: **25/11/2009**
Material analisado: **Solo**

NÚMERO DO LABORATÓRIO	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA
20158	1

DETERMINAÇÕES	AMOSTRAS
	20158
B Boro mg/dm ³	1,42
Cu Cobre mg/dm ³	0,6
Fe Ferro mg/dm ³	436
Mn Manganês mg/dm ³	1,22
Zn Zinco mg/dm ³	0,3

Extratores: B. Água Quente. Cu, Fe, Mn, Zn: DTPA
Sra

Responsável: **Coordenador Ademir Pedroso de Oliveira** C.R.Q.: 09902540



Assinatura

Rodovia PR 151, Km 288 - TeleFax: (42) 3232-2662 - Cx. Postal 1003 - CEP 84166-990 - Castro - Paraná - Brasil - CNPJ 78.594.025/0001-58 - Insc. Estadual: 90123853-71
E-mail: fabc@fundacaoabc.org.br / Site: www.fundacaoabc.org.br

ANEXO 2 – CHAVE UTILIZADA PARA IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Curvularia* (WATANABE, 2002).

Curvularia Boedijn

Bull. Jard. Bot. Buitenzorg 3, 13(1):127, 1933.

Type species: *C. lunata* (Wakker) Boedijn

Key to Species

- | | | |
|-------------------|---|------------------------|
| 1. Conidia | warted..... | <i>C. tuberculata</i> |
| | smooth..... | 2 |
| 2. Conidium hilum | conspicuous..... | 3 |
| | lacking or indistinct..... | 4 |
| 3. Conidia | mainly 4-celled, chlamydoconidia formed..... | <i>C. clavata</i> |
| | 4- to 5-celled, stroma formed..... | <i>C. protuberata</i> |
| 4. Conidia | mainly 4-celled..... | 5 |
| | 5-celled..... | 7 |
| 5. Conidia | with large penultimate cell, subellipsoidal..... | <i>C. lunata</i> |
| | with a septum centrally located..... | 6 |
| 6. Conidia | ellipsoidal, over 8.5 µm wide..... | <i>C. brachyspora</i> |
| | cylindrical or ellipsoidal under 8 µm wide..... | <i>C. pallescens</i> |
| 7. Conidia | often curved in one side..... | <i>C. prasadii</i> |
| | uncurved, or curved in both sides..... | 8 |
| 8. Conidia | almost uncurved, large and dark in central cells..... | <i>C. affinis</i> |
| | curved totally..... | <i>C. senegalensis</i> |

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)