



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA FUNGOS
UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS, ESPECIALMENTE
DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*)

ELIANDRA DE FREITAS SIA

MANAUS, AM
2012

ELIANDRA DE FREITAS SIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA FUNGOS
UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS, ESPECIALMENTE
DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do curso Multi-Institucional de Doutorado em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo, ESALQ/USP, Piracicaba/SP
Co-orientador: Dr. José Odair Pereira, UFAM, Manaus/AM

MANAUS, AM
2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Sia, Eliandra de Freitas

S562m Meios de cultura alternativos para fungos utilizando diferentes substratos, especialmente de mandioca (*Manihot esculenta*)/ Eliandra de Freitas Sia. - Manaus: UFAM, 2012.
88 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Co-orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

1. Fungos filamentosos 2. Fungos - Cultivo 3. Mandioca - I. Azevedo, João Lúcio de (Orient.) II. Pereira, José Odair (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 582.28(043.3)

*Aos meus pais, Olivio e Carmelinda, por acreditarem em mim desde
o início, por me apoiarem em todas as decisões e por dividirem
comigo cada momento especial da minha vida*

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, amizade e sabedoria;

Ao Prof. Dr. José Odair, pela dedicação, competência e contribuição;

À Prof.^a Dr.^a Aline A. Pizzirani-Kleiner, pela oportunidade de realização do trabalho no Laboratório de Genética de Micro-organismos;

À minha mãe Carmelinda de Freitas Sia, por sua determinação, coragem e estímulo constante;

Ao meu pai Olívio Bento Sia, pelo apoio incondicional;

Aos meus pequenos “grandes homens” João Pedro Sia e Ian Sia, pela forma que conduziram e facilitaram este percurso;

Ao meu esposo Adriano Ramos Miranda, pelo constante incentivo e companheirismo;

À minha família, especialmente meus irmãos Livio e Juliana e minha tia Zubeide, por acreditarem em mim e se orgulharem da minha formação;

À amiga Marta Medeiros pelo incentivo na busca de conhecimento.

À amiga Joelma Marcon, pela dedicação, compromisso e amizade;

Ao Eng. Agrônomo Fábio Luís Teles, pela contribuição e auxílios prestados;

À Universidade Federal do Amazonas e professores do Programa de Doutorado em Biotecnologia pela minha formação acadêmica;

A todos os colegas do Laboratório de Genética de Micro-organismo da ESALQ e em especial José Antônio da Silva, Danice Mazzer Luvizotto e Maria Carolina Quecine, pela companhia e auxílio prestados no laboratório;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não estão listados aqui.

Obrigada!

RESUMO

MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA FUNGOS UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS, ESPECIALMENTE DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*)

Os fungos filamentosos são um importante grupo de micro-organismos, não apenas por serem os mais numerosos dentre todos os micro-organismos, mas devido ao seu potencial em processos biotecnológicos como a produção de antibióticos e enzimas, fontes de vitaminas, alimentação e outros. Os fungos também são conhecidos como patógenos de plantas, animais e humanos, e produtores de toxinas. Cultivar fungos é uma rotina em laboratórios de microbiologia e um dos meios muito utilizado é o Batata Dextrose Ágar (BDA), que utiliza a batata como uma fonte rica em amido. Em algumas regiões do país, como a Região Norte, a batata tem um elevado custo e por este motivo a busca por novas fontes de amido é uma alternativa. Assim, outros vegetais devem ser pesquisados visando a substituição da batata. No presente trabalho foram inicialmente utilizados mandioca (*Manihot esculenta*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), cenoura (*Daucus carota*), gengibre (*Zingiber officinale*) e cará (*Dioscorea alata*), sendo demonstrado que a mandioca (*Manihot esculenta*) é uma alternativa relevante para o cultivo de fungos. Esta espécie vegetal é uma planta tropical de grande importância comercial no Brasil, na África e em outras regiões do mundo, sendo que para a região Norte a mandioca é muito cultivada e também de baixo custo. Assim, após a triagem inicial com outros tubérculos, foi realizada a avaliação e otimização do meio de cultura de Mandioca Dextrose Ágar (MDA). Para o ensaio do meio com mandioca foram utilizadas diversas espécies de fungos com importância biotecnológica (*Beauveria bassiana*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phanerochaete chrysosporium*). Foi avaliada a taxa de crescimento, a esporulação e a formação de hifas no meio de cultura BDA (utilizado como controle) e MDA. Os resultados comprovaram a eficiência do MDA para o crescimento dos fungos analisados, destacando-se a taxa de crescimento radial em meio sólido e peso seco do micélio em meio líquido. Entretanto, em MDA há uma menor esporulação dos fungos quando comparado ao BDA. Finalmente, foi realizado, utilizando meio BDA e MDA, o isolamento de fungos endofíticos de duas plantas: guaraná (*Paullinia cupana*) e oliveira (*Olea europea*), nos quais o meio de cultura MDA também se mostrou eficiente. A identificação de fungos endofíticos revelou que eles variaram conforme a planta hospedeira. A diversidade de fungos endofíticos foi maior em guaraná no meio MDA que em BDA, e o número de isolados foi menor em oliveira nos dois meios utilizados. Assim, do ponto de vista econômico e social, o substrato de mandioca pode ser considerado uma alternativa de alta potencialidade na obtenção de meios de cultura para laboratórios de micologia, especialmente em países tropicais.

Palavras Chaves: mandioca, fungos filamentosos, endófitos, BDA, MDA.

ABSTRACT

ALTERNATIVE FUNGAL CULTURE MEDIA USING DIFFERENT SUBSTRATE, ESPECIALLY CASSAVA (*Manihot esculenta*)

The filamentous fungi are an important group of microorganisms, being not only one of the most numerous among the microorganisms due to their potential in biotechnological processes such as the production of antibiotics, enzymes, vitamins and others. The fungi are also plant, animals and human pathogens, acting sometimes as toxins producers. The fungal growth is a routine practice at microbiological laboratories and the Potato Dextrose Agar (PDA) medium is the most used medium due to be a rich source of starch. However, in some regions of Brazil, the potato production has a quite high cost. For this reason the aiming of the present work was the search for new alternative sources of starch. Thus, initially several tubercles: cassava (*Manihot esculenta*), sweet potato (*Ipomoea batatas*), carrot (*Daucus carota*), ginger (*Zingiber officinale*) and yam (*Dioscorea alata*) were tested as a starch source to fungal growth. The cassava (*Manihot esculenta*) showed the best results to fungal growth. This species is a tropical plant with a great commercial importance to Brazil, Africa and other parts of the world. In Brazilian north and northeast regions, the cassava is hugely cultivated by a low cost. After the first screening, it was optimized the utilization of Cassava Dextrose Agar (CDA) media. Many fungal species of biotechnological importance (*Beauveria bassiana*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phanerochaete chrysosporium*) were evaluated to growth, development sporulation and hyphal formation. The BDA media was used as a control. The present results demonstrated a high efficiency of MDA to fungal growth. However, in MDA was observed a reduction of fungal sporulation comparing with BDA. Finally, both media BDA and MDA, were used to the endophytic fungal isolation from: guarana (*Paullinia cupana*) and olives (*Olea europea*). The fungal identification demonstrated that isolates varied according to host plant. The fungal diversity was higher in guaraná being higher using the MDA in comparison with the BDA media. To both media, it was obtained a low number of isolated fungi from *O. europea*. The present results clearly demonstrated that the cassava is an feasible important starch source, being a potential alternative media, mainly in tropical countries.

Keywords: cassava, filamentous fungi, endophytes, PDA, MDA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da técnica de isolamento de fungos endofíticos de folhas de <i>O. europea</i> e <i>P. cupana</i>	45
Figura 2- Exemplo da morfologia de colônias de um fungo utilizado (<i>Penicillium</i> sp.), em diferentes meios de cultura: Batata Dextrose Ágar (BDA), Cenoura Ágar (CA), Cenoura Dextrose Ágar (CDA), Mandioca Ágar (MA), Mandioca Dextrose Ágar (MDA), Batata-doce Ágar (BdA), Batata-doce Dextrose Ágar (BdDA), Cará Ágar (CaA), Cará Dextrose Ágar (CaDA), Gengibre Ágar (GA), Gengibre Dextrose Ágar (GDA).	50
Figura 3-a - Perfil de crescimento micelial de <i>Aspergillus niger</i> nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	51
Figura 3-b - Perfil de crescimento micelial de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	51
Figura 3-c - Perfil de crescimento micelial de <i>Fusarium</i> sp. nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	52
Figura 3-d - Perfil de crescimento micelial de <i>Beauveria bassiana</i> nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	52
Figura 3-e - Perfil de crescimento micelial de <i>Penicillium</i> sp. nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	53
Figura 4a - Perfil da contagem do número de esporos de <i>Aspergillus niger</i> nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	54
Figura 4b - Perfil da contagem do número de esporos de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	55
Figura 4c - Perfil da contagem do número de esporos de <i>Fusarium</i> sp. nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	55

Figura 4d - Perfil da contagem do número de esporos de <i>Beauveria bassiana</i> nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	56
Figura 4e - Perfil da contagem do número de esporos de <i>Penicillium</i> sp. nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).	56
Figura 5- Exemplo de crescimento micelial de um fungo utilizado (<i>Beauveria bassiana</i>) em 4, 10, 12 e 14 gramas (substrato de mandioca, MDA).	58
Figura 6 - A) Exemplo do crescimento de fungos endofíticos a partir de fragmentos de folhas de oliveira em meio BDA e MDA e B) Crescimento de fungos endofíticos da planta de guaraná em meio BDA e MDA.	62
Figura 7 - Extração de DNA total dos isolados de plantas de guaraná e oliveira. As primeiras canaletas de ambos os géis representam marcadores moleculares referentes a 25, 50 e 100 ng/ μ l, respectivamente.	63
Figura 8 - Amplificação do gene ribossomal ITS1 e ITS4 de isolados endofíticos de planta de guaraná e oliveira. As bandas observadas possuem aproximadamente 550-600pb, conforme esperado. A primeira canaleta foi carregada com marcador 1Kb.	64
Figura 9 - Análise filogenética formada por isolados referentes à planta de guaraná. A filogenia foi realizada pelo programa Mega5 baseada na comparação de sequências de cerca de 500pb do gene 16S rRNA com sequências disponíveis nos bancos de dados. Os agrupamentos foram calculados com o método muscle, e os dados nos ramos indicam valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações.	72
Figura 10 - Análise filogenética formada por sequências referentes à planta de oliveira. A filogenia foi realizada pelo programa Mega5 baseada na comparação de sequências de cerca de 500pb do gene 16S rRNA com sequências disponíveis nos bancos de dados. Os agrupamentos foram calculados com o método muscle, e os dados nos ramos indicam valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações.	73
Figura 11 - Diagrama de Venn construído a partir da separação dos grupos taxonômicos operacionais (UTOs).	74

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional da cenoura (100g).	18
Tabela 2 – Composição nutricional do cará (100g).	19
Tabela 3 - Composição nutricional de gengibre (100g).	21
Tabela 4 – Composição nutricional da batata (100g).	22
Tabela 5 - Composição nutricional de batata-doce (100g).	23
Tabela 6 - Propriedades nutricionais de mandioca (100g).	27
Tabela 7 - Ocorrência de algumas espécies de <i>Fusarium</i> de acordo com a sua forma de adaptação a diferentes ambientes climáticos.	30
Tabela 8 - Composição média de 100g de matéria fresca de batata-doce, mandioca, cenoura, batata, cará e gengibre.	40
Tabela 9 - Isolados de fungos utilizados no trabalho e seu valor biotecnológico.	40
Tabela 10 - Plantas utilizadas para o isolamento de fungos endofíticos.	44
Tabela 11 - Crescimento micelial dos fungos em meio BDA e em diferentes concentrações de substrato de mandioca. Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey, letras iguais indicam diferenças não significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).	58
Tabela 12 - Esporulação dos fungos em meio BDA e em diferentes concentrações de substrato de mandioca. Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey, letras iguais indicam diferenças não significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).	59
Tabela 13 - Peso seco dos fungos em meio BD e na concentração de 14g de substrato de mandioca. Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey, letras iguais indicam diferenças não significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).	59
Tabela 14 - Crescimento micelial e esporulação do fungo <i>Panerochaete chrysosporium</i> em meio BDA e em diferentes concentrações de MDA com duas variedades de mandioca. Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre os resultados ($P \leq 0,05$).	61
Tabela 15 - Peso seco micelial do fungo <i>Panerochaete chrysosporium</i> em meio BD na concentração de 14g de MD entre duas variedades de mandioca. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre os resultados ($P \leq 0,05$).	61

Tabela 16 – Identificação molecular de fungos otidos de oliveira e guaraná pelo seqüenciamento da região ITS do rDNA.....	65
Tabela 16 - Identificação molecular de fungos otidos de oliveira e guaraná pelo seqüenciamento da região ITS do rDNA (Continuação...).....	66
Tabela 16 - Identificação molecular de fungos otidos de oliveira e guaraná pelo seqüenciamento da região ITS do rDNA (Final).	67
Tabela 17 - Gêneros de fungos endofíticos encontrados nas plantas de guaraná e oliveira. ...	68

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata Dextrose Ágar
BdDA	Batata-doce Dextrose Ágar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CaDA	Cará Dextrose Ágar
CDA	Cenoura Dextrose Ágar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
EUA	Estados Unidos da América
GeDA	Gengibre Dextrose Ágar
GenBank	Genetic Codes Databank
HCN	Ácido Cianídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISSR	Inter Single Sequence Repeats (sequências repetidas internas simples)
ITS	Internal Transcribed Sequences (sequências internas transcritas)
KCL	Cloreto de potássio
MDA	Mandioca Dextrose Ágar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbor - Joining
PCB	Polychlorinated Biphenyl
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase (Polimerase chain reaction)
PEG	Polietileno Glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
rDNA	DNA Ribossomal
RNA	Ácido Ribonucléico
TNT	Trinitrotolueno
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Meios de cultura em microbiologia.....	16
2.2. Vegetais que podem ser utilizados em meios de cultura para crescimento de fungos..	17
2.2.1. Cenoura.....	17
2.2.2. Cará.....	19
2.2.3. Gengibre.....	20
2.2.4. Batata	21
2.2.5. Batata-doce.....	22
2.2.6. Mandioca.....	23
2.2.6.1. Origem e disseminação no mundo.....	23
2.2.6.2. Mandioca como produto de importância mundial	24
2.2.6.3. Valor nutricional, toxicidade e aplicação da mandioca	26
2.3. Características dos gêneros de fungos utilizados em testes de avaliação de meios de cultura em diferentes substratos.....	28
2.3.1. O Gênero <i>Beauveria</i>	28
2.3.2. O Gênero <i>Fusarium</i>	29
2.3.3. O Gênero <i>Aspergillus</i>	30
2.3.4. O Gênero <i>Penicillium</i>	31
2.3.5. O Gênero <i>Phanerochaete</i>	33
2.4. Fungos endofíticos e sua utilização nos ensaios com novos meios de cultura	35
2.5. Características das plantas utilizadas no presente trabalho para isolamento de fungos endofíticos	35
2.5.1. Oliveira	35
2.5.2. Guaraná.....	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39

4.1. Escolha de material como substrato para meios de cultura	39
4.2. Isolados fúngicos utilizados	40
4.3. Preparo dos meios de cultura	41
4.3.1. Meio BDA (Batata Dextrose Ágar)	41
4.3.2. Meio MDA (Mandioca Dextrose Ágar) e meios com outros substratos	41
4.4. Análise do crescimento micelial e esporulação de fungos nos diferentes meios de cultura	42
4.4.1. Crescimento radial em meios sólidos	42
4.4.2. Esporulação dos fungos em meio sólido	43
4.4.3. Crescimento dos fungos em meio líquido (peso seco)	43
4.4.4. Análises e Estatísticas do crescimento e esporulação dos fungos	43
4.5. Isolamento de fungos endofíticos	44
4.5.1. Método de isolamento de fungos endofíticos de folhas	44
4.5.2. Análise de variância dos fungos endofíticos isolados	45
4.5.3. Análises da diversidade de fungos endofíticos	46
4.5.3.1. Identificação Molecular	46
4.5.3.2. Diversidade dos fungos endofíticos e construção da Árvore Filogenética	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Crescimento micelial	48
5.2. Contagem de esporos: esporulação	53
5.3. Padronização do meio Mandioca Dextrose Ágar (MDA)	57
5.4. Avaliação do peso seco do micélio	59
5.5. Avaliação da mandioca brava x mandioca mansa	60
5.6. Isolamento de fungos endofíticos em meio MDA e BDA	61
5.7. Diversidade de fungos endofíticos isolados em MDA e BDA de duas espécies vegetais	62
5.7.1. Caracterização filogenética dos fungos endofíticos isolados das plantas de guaraná e oliveira	69
6. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta dos micro-organismos, o homem vem buscando formas de estudá-los e utilizá-los em seu benefício. Isolar, identificar e classificar vem sendo uma rotina constante nos laboratórios de microbiologia nas áreas da medicina, da indústria farmacêutica e alimentícia e na agricultura, dentre outras. Um dos primeiros passos é como cultivá-los em meios de cultura artificiais que ofereçam condições para seu desenvolvimento e multiplicação. Segundo Carnaúba et al. (2007) a composição do meio de cultura determina a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fungos, ressaltando também a importância da temperatura e fotoperíodo.

O Batata Dextrose Ágar (BDA) é um meio bastante utilizado, devido ter sua metodologia já estabelecida por Riker e Riker (1936), e sua comprovada eficiência no cultivo de fungos. Nozaki et al. (2004) afirmaram que nem sempre as condições dos meios de cultura permitem um bom crescimento e esporulação. Alguns meios favorecem determinados grupos e espécies de micro-organismos, mas não apresentam a mesma eficiência para outros, mesmo sendo estes da mesma espécie, e isso pode ser explicado pela presença ou não de metabólitos específicos para cada micro-organismo conforme afirmam Carnaúba et al. (2007).

Sabe-se que a batata (*Solanum tuberosum*) espécie originária de regiões frias do Peru, foi levada pelos espanhóis para a Europa e disseminada para o resto do mundo. No Brasil, um país tipicamente tropical, a batata é explorada principalmente na região Sul, apresentando-se como alimento relativamente caro, com disponibilidade restrita em algumas regiões como Norte e Nordeste. Existem alternativas que substituem a batata em meios de cultura. A cenoura foi utilizada por Lima (1996) mostrando-se eficiente para isolamento micelial de isolados de ramos de mangueira, tanto quanto o BDA. Os seus resultados demonstraram que outros tubérculos utilizados, como a mandioca, tiveram desempenho semelhante ao BDA.

A busca de novas fontes de tubérculos alternativos para região em que a batata onera o processo vem sendo uma constante. Farinha, aveia, extrato de tomate e extrato vegetal vêm sendo analisados para as mais diferentes espécies de fungos e bactérias (CARNAÚBA et al., 2007; BRUNELLI et al., 2006).

A mandioca é uma espécie de grande importância econômica em países tropicais como: Zaire, Nigéria, Madagascar na África; Indonésia, Tailândia e China na Ásia, dentre outros. No Brasil, embora seu maior consumo de certo modo concentre-se no Nordeste, no Norte e no Centro-oeste, ela está presente também em todo o território nacional, com maior disponibilidade nas regiões Norte e Nordeste.

A mandioca é um importante produto de subsistência e está entre as maiores fontes básicas de alimento no mundo (SILVA, 1996). Esse vegetal além do valor econômico reflete também um grande valor cultural, estando suas origens profundamente ligadas às origens dos Índios da América do Sul. Historicamente, a cultura da mandioca teve papel importante em todos os períodos do Brasil desde a colonização e, pode ainda, ser um dos alicerces de um desenvolvimento sustentável. Outros tubérculos como a batata-doce, a cenoura, o gengibre e o cará também podem ser utilizados para o preparo de meios de cultura de fungos e avaliadas suas qualidades em comparação com os meios de mandioca e batata. Assim, a análise de meios de cultura com estes tubérculos, torna-se uma alternativa relevante dentro da microbiologia e justifica o trabalho, uma vez que essas espécies crescem bem em regiões tropicais e, especialmente a mandioca, é de origem tropical, de fácil acesso e com valor de comércio relativamente baixo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Meios de cultura em microbiologia

Desde os primórdios da microbiologia como ciência, houve uma busca por meios de cultura que fossem apropriados para o crescimento de fungos e bactérias além de outros tipos de micro-organismos. Louis Pasteur, considerado o pai da Microbiologia e principalmente da bacteriologia usava meios líquidos ricos como os que continham extrato de carne. Entretanto, o cultivo em meio líquido impedia ou tornava muito difícil o isolamento de espécies puras. Foi Robert Koch que em 1882 introduziu o meio sólido em microbiologia, por sugestão de Fannie Hesse, mulher de Walther Hesse que trabalhava no laboratório de Koch. Primeiramente foi usada a gelatina para solidificar meios de cultura, mas ela se liquefazia em temperaturas ainda altas, o que impedia seu uso na época de verão no hemisfério Norte. Apenas foi possível o uso de um meio sólido apropriado, após a substituição da gelatina pelo ágar proveniente de algas marinhas que não se liquefazia em altas temperaturas e se mantinha sólido também em temperaturas maiores que as do meio ambiente. O meio sólido permitiu a obtenção de colônias isoladas e a separação de espécies de bactérias e fungos com certa facilidade. A microbiologia também se desenvolveu pela introdução de meios ricos, completos ou complexos (com extrato de carne ou peptona, por exemplo) e meios minerais, pobres ou mínimos (com sais minerais e uma fonte de carbono). Foram também criados meios seletivos, que permitem selecionar uma ou poucas espécies de micro-organismos, além de meios diferenciais que se distinguem pela morfologia e cor de algumas espécies em relação a outras. Desta maneira, a área de produção de diferentes meios de cultivo foi progredindo e muitos outros foram criados, bem como empresas que produzem e comercializam tais meios. Vários livros de Microbiologia relatam as fases iniciais em relação ao desenvolvimento dos meios de cultura, como por exemplo, Basic Microbiology de Volk e Wheeler (1988).

Deve ser salientado que o desenvolvimento da Microbiologia ocorreu em regiões de clima temperado principalmente em países como França e Alemanha, na Europa. Desta forma, era de se esperar que a base destes meios fosse constituída principalmente de vegetais de clima temperado, mesmo os introduzidos de outras regiões na Europa, como a batata. Devido a este fato, os meios de cultura de fungos até hoje levam estes materiais em sua composição como o BDA, o de Cenoura, de Aveia, Cevada e outros. Já os meios mínimos como o Sabouraud e Czapeck Dox com composição mineral e definida, variam menos. Estudos com meios de cultura mais adaptados aos países de regiões tropicais do mundo, como boa parte da América Central e do Sul, bem como a África, são em pouco número, embora alguns esforços tenham sido feitos neste sentido como os mencionados na introdução desta tese.

2.2. Vegetais que podem ser utilizados em meios de cultura para crescimento de fungos

2.2.1. Cenoura

A cenoura (*Daucus carota*) é uma planta originária no norte da África, mais especificamente na região do mediterrâneo, pertencente a família das Umbelíferas (Apiaceae). Sua introdução no Brasil ocorreu juntamente com o processo de colonização e expansão portuguesa no país no século XVI. Entretanto, pressupõe-se que as primeiras lavouras só foram instaladas no século XIX no Sul do país (VILELA e BORGES, 2008).

A cenoura é relatada por suas propriedades nutricionais (Tabela 1). Um dos seus principais componentes é a presença em grande quantidade de β -caroteno, substância precursora da vitamina A, responsável por diversas funções na nutrição humana. A presença de açúcares solúveis (como sacarose, glicose e frutose) também destaca-se em quantidade neste vegetal, chegando a representar 70% da matéria seca das raízes (FINGER et al., 2005).

Tabela 1 - Composição nutricional da cenoura (100g).

Componentes	Unidade	Quantidade
calorias	Kcal	43,00
gorduras	g	0,19
carboidratos	g	10,14
fibras	g	3,00
proteínas	g	1,03
sódio	mg	35,00
potássio	mg	323,00
cálcio	mg	27,00
ferro	mg	0,50
zinco	mg	0,20
vitamina A	UI*	12.000
vitamina C	mg	9,00
vitamina E	mg	0,46

*UI = unidades internacionais

Fonte: Vieira e Makishima (2000).

Entretanto esses valores podem variar de acordo com o desenvolvimento da planta. Nos estudos de Ribeiro Filho et al. (2011), observou-se que as características nutricionais na cenoura tendem a variar de acordo com o período de desenvolvimento da cultura.

As cenouras são grandes fontes de fibra dietética, antioxidantes, minerais e β -caroteno. Este último, responsável pela coloração alaranjada característica do vegetal, é uma provitamina A (substância que dá origem à vitamina A dentro de um organismo vivo). As cenouras, originalmente, apareciam com cores púrpura, branca e amarela. A cenoura laranja, que é hoje sinônimo de cenoura, foi desenvolvida na Holanda como tributo a Guilherme I de Orange ("orange" = "laranja") durante a guerra holandesa de independência da Espanha, no século XVI. É considerado o alimento com maior quantidade de β -caroteno, além disso, tem seu consumo recomendado por ser uma grande fonte de fibra e potássio (GONZAGA e RODRIGUES, 2001).

2.2.2. Cará

Cará (*Dioscorea alata*) é um tubérculo subterrâneo, algumas vezes confundido com o inhame e o cará aéreo, pertence à família Dioscoreacea. É uma espécie exótica, com seu centro de origem na Ásia tropical, mas já era cultivada na África. Trata-se de uma espécie monocotiledônea, herbácea, dióica, com hábito de crescimento rasteiro (trepadeira) (FERREIRA et al., 2010).

O gênero *Dioscorea* apresenta cerca de 600 espécies. Apesar de ser elevado o número de espécies de *Dioscorea*, apenas cinco são consideradas importantes na alimentação humana: *D. cayenensis*, *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta* e *D. trifida*. O cará é planta do grupo das olerícolas, muito rústica, que produz tubérculos comestíveis, é amplamente cultivada em regiões tropicais e serve de alimento na América Central e Sul, na Ásia e nas ilhas do Pacífico (MONTALO, 1991). O Cará é cultivado nas regiões Norte, Sul e Centro Sul, sendo São Paulo o mais importante estado produtor (MOURA, 2006).

Ferreira et al. (2010), apontam a importância do cará na alimentação como uma boa fonte energética. Segundo os autores, o vegetal era dado aos escravos para suportarem as grandes viagens de migração no período da escravidão. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária - SEAGRI (2012) e Azevedo e Duarte (1998), destacam as propriedades nutricionais deste alimento contendo altos teores de proteína, cálcio e fósforo (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição nutricional do cará (100g).

Componentes	Unidade	Quantidade
calorias	Kcal	135
proteínas	g	2,3
cálcio	mg	28
fósforo	mg	52
ferro	g	2,9
vit. A	mg	30
vit. B1	mg	0,04
vit. B2	mg	0,02
vit. C	mg	3,5

Fonte: SEAGRI (2012); Azevedo e Duarte (1998).

Azevedo e Duarte (1998), ainda destacam que o cará é rico em carboidratos, proteínas, riboflavina e ácido nicotínico. Substâncias que possuem alto poder energético e atuam na prevenção de varias doenças, atuando como antioxidantes, antiespasmódicos e antiinflamatórios (PÉREZ, 2006).

2.2.3. Gengibre

O gengibre (*Zingiber officinale*) é natural do sudeste asiático, de onde se difundiu pelas regiões tropicais do mundo. Seu rizoma é comercializado fresco, em conserva, seco, picado, em pó ou óleo essencial (ELPO e NEGRELLE, 2006). O gengibre possui sabor apreciado na culinária do mundo moderno. Cereda (2001) relata suas propriedades nutricionais e seu valor energético (Tabela 3).

É uma planta herbácea da família das Zingiberaceae que pode atingir mais de 1m de altura. As folhas verde-escuras nascem a partir de um caule duro, grosso e subterrâneo (rizoma). As flores são tubulares, amarelo-claro e surgem em espigas eretas. Como planta medicinal o gengibre é uma das mais antigas e populares do mundo, sendo que suas propriedades terapêuticas são resultado da ação de várias substâncias, especialmente do óleo essencial que contém canfeno, felandreno e zingibereno (GONZAGA e RODRIGUES, 2001). Outro ponto destacado é a presença de gingerol que é uma substância antioxidante, antifúngica, antiinflamatória, analgésica, antipirética, que é explorada pela indústria farmacêutica em tratamento contra câncer, doenças cardíacas e respiratórias (TOZZI, 2011). Essas propriedades devem-se à presença de óleos essenciais que se acumulam nos rizomas (SUKLA, 2007).

Tabela 3 - Composição nutricional de gengibre (100g).

Componentes	Unidade	Quantidade
Calorias	Kcal	301,0
glicídios	mg	72,0
protídeos	mg	7,6
Lipídeos	mg	2,9
sódio	mg	6,0
potássio	mg	264,0
cálcio	mg	51,0
ferro	mg	2,77
fósforo	mg	78,0

Fonte: Cereda (2001).

2.2.4. Batata

A batata (*Solanum tuberosum*) é um vegetal da família das solanáceas, apresenta caules aéreos, herbáceos e suas raízes originam-se nas bases desses caules ou hastes.

A história deste vegetal começou há cerca de 8.000 anos, próximo a fronteira entre o Peru e a Bolívia, e foi introduzida na Europa no século XVI pelos conquistadores espanhóis (FAO, 2008).

A batata como hoje conhecemos chegou ao Brasil pelas mãos dos imigrantes europeus, no final do século XIX, e foi levada para áreas de clima temperado ao sul do país, favorecendo seu cultivo (PEREIRA, 2008). É atualmente um dos tubérculos mais consumidos do mundo e se tornou componente de vários pratos. Alimento rico em grãos de amido, armazenados nos amiloplastos e que possui vitamina B, C, ferro e zinco (PEREIRA, 1987). A composição nutricional da batata pode ser vista na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição nutricional da batata (100g).

Componentes	Unidades	Quantidade
água	%	77
calorias	Kcal	88,24
proteína	g	2,21
ácidos graxos polinsaturados	g	0,07
carboidratos	g	19,85
cálcio	mg	5,15
fósforo	mg	44,12
ferro	mg	0,29
potássio	mg	378,68
sódio	mg	3,68
tiamina	mg	0,1
riboflavina	mg	0,02
niacina	mg	1,47

Fonte: Giuntini et al., (2006).

2.2.5. Batata-doce

A batata-doce é a raiz tuberosa da espécie *Ipomoea batatas*, uma planta da família das convolvuláceas, ordem das Solanales (a mesma da batata, do tomate, das pimentas, entre outras). É originária da América Tropical, tendo como provável centro de diversidade o Noroeste da América do Sul. Possui diversas variedades cultiváveis divididas em de mesa, ou mercado, e as forrageiras, ambas podendo ser encontradas nas cores externas amarela, branca e roxa. No entanto, o número de variedades não se restringe a essas características. Elas podem ser classificadas de acordo com o formato, tamanho, cor interna, dulçor, precocidade, cor das folhas e até pela coloração das flores.

Quanto às suas propriedades nutricionais destacam-se os razoáveis teores de cálcio, ferro, sódio, fósforo e potássio (Tabela 5), como também vitaminas A, B e C, fonte de carotenóides. A batata-doce é um ótimo alimento energético devido seu alto teor de

carboidratos. Entretanto, os níveis protéicos são baixos, fazendo com que este alimento não seja considerado um alimento completo (CEREDA, 2001).

Tabela 5 - Composição nutricional de batata-doce (100g).

Componentes	Unidade	Quantidade
calorias	Kcal	125,5
glicídios	mg	28,0
protídeos	mg	1,3
lipídeos	mg	0,8
sódio	mg	50,2
potássio	mg	331,4
cálcio	mg	43,0
ferro	mg	2,40
fósforo	mg	46,0

Fonte: Cereda (2001).

2.2.6. Mandioca

2.2.6.1. Origem e disseminação no mundo

Segundo Magalhães (1876), conta a lenda, que a mandioca surgiu quando a filha de um poderoso índio Tuxaua foi expulsa de sua tribo e foi viver em uma velha cabana distante, por ter engravidado misteriosamente. Parentes longínquos iam levar-lhe comida para seu sustento, e assim a índia viveu até dar a luz a uma linda menina, muito branca, a qual chamou de Mani. A notícia do nascimento se espalhou por todas as aldeias e fez o grande chefe Tuxaua esquecer os rancores e cruzar os rios para ver sua filha. O avô se rendeu aos encantos da linda menina que se tornou muito amada por todos. No entanto, ao completar três anos Mani morreu de forma misteriosa, sem nunca ter adoecido. A mãe ficou desolada, enterrou a filha perto da cabana onde vivia e, sobre ela, chorou por horas. Nesse local, acabou nascendo uma planta que mostrava raízes grossas e brancas em forma de chifre. Todos queriam provar, em honra daquela criança que tanto amavam. Desde então a mandioca passou a ser um

excelente alimento para os índios. O nome mandioca se originou da seguinte forma: *Mandi* (vindo do Mani que era o nome da criança) e *oca* (a casa do índio).

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma planta dicotiledônea da família Euphorbiaceae do gênero *Manihot*. Este gênero compreende várias espécies das quais destacam, do ponto de vista econômico, a *M. utilissima* Pohl (sinonímia da espécie *M. esculenta* Crantz) e a *M. dulcis* Pax. A principal diferença botânica existente entre estas duas espécies parece residir no fruto que na *M. utilissima* Pohl é alado, e na espécie *M. dulcis* Pax é liso.

Esta planta de origem brasileira é conhecida por vários outros nomes, como cassava, tapioca, manioc, manihot, aipim, macaxeira, entre outros (VIOLA et al., 1988). Sua cultura é das mais antigas e tradicionais do Brasil (GOMES e PEÑA, 1997). A partir da América do Sul, a propagação de mandioca foi feita para outras partes do mundo. Foi introduzida na costa ocidental da África e do Zaire no final do século XVI, provavelmente por navios negreiros. Foi introduzida no Leste da África (Madagascar e Zanzibar), através da Ilha da Reunião até ao final do século XVIII e em 1800 tinha atingido a Índia. Amplamente cultivada na África e na Ásia, por volta de 1850. Hoje em dia, é explorada em todo o território brasileiro, em todos os países Sul e Centro-americano e nas Antilhas. Em outras regiões do mundo de clima tropical e subtropical, cultiva-se igualmente a mandioca, principalmente em Java, nas Filipinas, no Ceilão, na Tailândia, na China, em grande parte da África e em Madagascar.

2.2.6.2. Mandioca como produto de importância mundial

A mandioca é uma espécie domesticada há cerca de seis a sete mil anos atrás pelas populações pré-colombianas com o objetivo de armazenar amido nas raízes e ser multiplicada vegetativamente. O processo seletivo foi tão eficiente que se tornou a base alimentar de várias populações indígenas e complementar para outras. Até os dias de hoje desempenha importante

papel sócio econômico em vários países tropicais, principalmente na África e na América do Sul. A mandioca é uma das mais importantes fontes de carboidrato para a alimentação humana em países tropicais e subtropicais. Permite a sobrevivência de aproximadamente 10% da população mundial (SILVA, 1996). É a quarta fonte de calorias nas regiões tropicais depois do arroz, trigo e milho. Da produção mundial, 60% são utilizados para consumo humano nos países em desenvolvimento. A cultura da mandioca ocupa uma área de 18,6 milhões de hectares no mundo e contribui para a alimentação de mais de 700 milhões de pessoas nos países em desenvolvimento. Os principais produtores de mandioca são a Nigéria, o Brasil, a Indonésia, a Tailândia, o Congo e Gana. Juntos, são responsáveis por 61,8% da produção mundial, segundo números da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (PEROZZI, 2008).

É uma planta que pode ser facilmente encontrada nos quintais brasileiros. É também cultivada em áreas mais expressivas com propósitos comerciais visando aos mercados hortifrutigranjeiros. O Brasil é o segundo maior produtor mundial, respondendo com 10% da produção, atrás apenas da Nigéria (FAO, 2008), sendo cultivada em todas as regiões, com produção nacional de 1,9 milhões de hectares e rendimento médio de 27,1 milhões de toneladas anuais, tanto para o consumo da indústria quanto para o consumo doméstico (IBGE, 2009).

Segundo Marques et al. (2000), os valores da composição química da raiz não são homogêneos e padronizados devido a diversos fatores, como nível tecnológico da indústria, qualidade da mão de obra, metodologia de análise, bem como as variedades de mandioca.

A mandioca é uma espécie chave nos sistemas itinerantes existentes no Brasil por várias razões: *i* há consenso que a mandioca foi domesticada nas terras baixas e quentes das Américas; *ii* a relação da espécie com os povos aqui existentes é muito antiga e a passagem do estado selvagem para o estado domesticado está permeada por toda uma ampla variedade de

técnicas e usos; *iii* existência de um grande número de variedades locais. Esta espécie é preponderantemente de propagação vegetativa que, entretanto, não perdeu a capacidade de reprodução via processo sexual. Isso favorece o surgimento da variabilidade em roças itinerantes, pois possibilita o cruzamento entre variedades diferentes, permite autofecundação, e cruzamentos entre espécies do mesmo gênero. Nas condições de cultivo itinerante, isso faz com que os processos geradores de variabilidade estejam sob influência tanto de processos de seleção artificial como processo de seleção natural, fazendo com que a espécie esteja sob contínua dinâmica evolutiva (PERONI et al., 1999).

2.2.6.3. Valor nutricional, toxicidade e aplicação da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), conhecida também como macaxeira, mandioca mansa, doce, de mesa ou aipim, é bastante cultivada para o consumo *in natura*. Diferencia-se da mandioca “brava” por apresentar baixos teores de ácido cianídrico (HCN) na polpa crua de raízes frescas, geralmente abaixo de 50 mg/ kg de polpa (FUKUDA et al., 2006). As variedades de mandioca chamadas “bravas” possuem raízes que quando ingeridas, cruas ou mesmo cozidas, podem provocar intoxicações, porque encerram uma substância (um glicosídeo cianogenético de nome “linamarina”) capaz de produzir HCN quando em presença de ácidos ou enzimas do estômago. As variedades mansas (aipins ou macaxeiras) também o encerram, porém em quantidades inócuas. A secagem (pelo calor do sol ou de secadores) elimina o veneno por volatilização. A cocção pode não eliminar totalmente, razão pela qual a mandioca brava, ainda que cozida pode ocasionar acidentes, o que não acontece com os seus produtos de indústria. A presença desse tóxico é constatada em todas as partes do vegetal aéreas e subterrâneas, as folhas acusam as maiores porcentagens. Na raiz, no córtex, ou casca grossa, apresentam teores mais elevados do que a polpa. A variação do teor de HCN nas plantas de mandioca está não somente na dependência da variedade, idade das plantas (as mais

jovens em geral são mais ricas), como também está sujeita a influência do meio ambiente, como solo, clima e altitude. Esses teores se alteram de acordo com a variedade, idade e época de colheita e condições ambientais (DIAS et al., 2003). Tanto a mandioca mansa como a brava, do ponto de vista nutricional, são ricas em carboidratos e consideradas como ótimas fontes de calorias (132 kcal por 100 gramas da sua parte comestível). Apresentam baixo conteúdo de proteína (1% do peso fresco), níveis aceitáveis de algumas vitaminas do complexo B e C, alguns minerais, como cálcio, fósforo, ferro (Tabela 6), e praticamente não possuem gordura (0,20%). No entanto, são ricas em fibras. As mandiocas com polpas de coloração amarela e creme são importantes na alimentação humana, porque possuem consideráveis teores de β -caroteno, precursor da vitamina A (DIAS et al., 2003).

A mandioca é cultivada para a produção de raízes destinadas ao consumo humano, animal e para a indústria, e com relação à indústria mais de 600 produtos podem ser obtidos da fécula de mandioca para utilização em vários setores, que compreendem desde a indústria de alimentos, indústria siderúrgica, farmacêutica, alimentação animal, indústria têxtil e de papel. A planta voltou a entrar na pauta de discussão para a produção de etanol desde que se intensificou a busca por combustíveis renováveis e não poluentes. O amido também é uma das matérias-primas mais cotadas para substituir os produtos de plástico fabricados com derivados de petróleo.

Tabela 6 - Propriedades nutricionais de mandioca (100g).

Componentes	Unidade	Quantidade
potássio	mg	343,7
sódio	mg	40,6
cálcio	mg	43
fósforo	mg	140
ferro	mg	0,5
vit. A	μ g	2
vit. B1	μ g	300
vit. B2	μ g	72
vit. C	μ g	49

Fonte: Cereda, 2003.

2.3. Características dos gêneros de fungos utilizados em testes de avaliação de meios de cultura em diferentes substratos.

2.3.1. O Gênero *Beauveria*

Com base em Alexopoulos e Mins (1979), que adotaram o Reino Fungi proposto por Whittaker (1969), o fungo *Beauveria* é um Deuteromiceto pertencente à ordem Moniliales. Este gênero foi primeiramente descrito por Beauverie em 1911 e Vuillemin em 1912 e se caracteriza por apresentar micélio branco ou levemente corado, hifas hialinas, finas e septadas, e conidióforos únicos, irregularmente agrupados ou em cachos verticulados (McLEOD, 1954) reproduzindo-se de forma vegetativa, via conídios e segmentos hifais. Desde a sua classificação, este gênero tem sido sujeito a uma considerável investigação taxonômica. Após revisão do gênero por De Hoog (1972), detectou-se a existência de duas espécies: *B. bassiana* e *B. brongniartii* (*B. tenella*), as quais se diferenciam entre si quanto ao formato dos conídios. De acordo com McLeod (1954), os conídios de *B. brongniartii* são elipsoidais, ao contrário dos conídios de *B. bassiana* que são globosos quando cultivados em meio sólido. Em meio líquido aerado ou na hemolinfa dos insetos, os conídios assumem formas elipsoidais, semelhantes a estruturas leveduriformes que são conhecidas pelo nome de blastósporos (FERRON, 1978).

Dentre os fungos descritos como entomopatogênicos, estão os mitospóricos pertencentes à morfodivisão Deuteromycetes, incluindo-se dentre eles, os gêneros *Aschersonia*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Tolypocladium* e *Verticillium*. No Brasil, os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem relatados, sendo provável que a maioria dos 85 gêneros de fungos entomopatogênicos até hoje descritos ocorra no Brasil, embora somente 20 deles tenham sido constatados atacando insetos de importância agrícola em nosso país.

Fungos entomopatogênicos economicamente importantes na agricultura estão sendo estudados e usados com sucesso no controle de pragas. A dinâmica das doenças de insetos, sua distribuição e intensidade de ocorrência receberam maior atenção nas últimas décadas (FUXA e TANADA, 1987; ALVES, 1998; MELO e AZEVEDO, 2000). Este fato provavelmente deve-se ao sucesso de alguns programas de controle biológico e ao efeito de patógenos que provocam epizotias, como as espécies de fungos *B. bassiana* e *M. Anisopliae* (PEDIGO et al., 1953; ALVES, 1998; MELO e AZEVEDO, 2000).

Segundo Smith e Grula (1981), a simplicidade de exigências nutricionais de *B. bassiana*, para o qual o necessário para o crescimento micelial é uma fonte de nitrogênio, e sua germinação requerer apenas uma fonte simples utilizável de carbono, possibilitou o emprego desta espécie em experimentos laboratoriais, uma vez que ela pode crescer facilmente nos mais diferentes ambientes naturais ou artificiais (SCHAERFFENDERG, 1964; AOKI e CHIOUSA, 1968; AOKI e YANASE, 1970; KUCERA, 1971). Fatores como pH do meio, umidade relativa, temperatura e luz podem também interferir na germinação de esporos e sobrevivência de *B. bassiana*. A temperatura ótima para o crescimento desta espécie está entre 20 e 25°C (FERRON, 1981) ou 20 a 30°C (FARGUES et al., 1992), apesar de poder suportar temperaturas de até 45°C (ALVES, 1998).

Por infectar uma ampla classe de insetos e ser comum na natureza (McCOY et al., 1988; CASTRILLO et al., 2003) este fungo tem sido usado em todo o mundo, isoladamente ou associado a outros fungos, como inseticida microbiano no controle de pragas da agricultura (HAJEK e EASTBURN, 2001; RAO et al., 2006).

2.3.2. O Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809. Já se passaram mais de 200 anos e ainda não se possui um sistema completo que possibilite a identificação das

espécies de *Fusarium*. Atualmente, todos os sistemas de taxonomia têm como base a publicação de Wollenweber e Reinking (1935), combinando as informações complementares de outros sistemas (NELSON et al., 1983; BURGUES et al., 1994). Os fungos deste gênero são importantes como causadores de inúmeras doenças de plantas. Também tem sido utilizado na produção de hormônios de crescimento vegetal. Estes fungos apresentam ampla distribuição geográfica, havendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes, ocorrendo predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Ocorrência de algumas espécies de *Fusarium* de acordo com a sua forma de adaptação a diferentes ambientes climáticos.

Ocorrência Geral	Regiões de Clima Temperado	Regiões Subtropicais e Tropicais
<i>F. chlamydosporum</i>	<i>F. acuminatum</i>	<i>F. beomiforme</i>
<i>F. equiseti</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. compactum</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>F. crookwellense</i>	<i>F. decemcellulare</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. longipes</i>
<i>F. poae</i>	<i>F. graminearum</i>	
<i>F. semitectum</i>	<i>F. sambucinum</i>	
<i>F. solani</i>	<i>F. esporotrichioides</i>	
<i>F. subglutinans</i>		
<i>F. tricinctum</i>		

Fonte: Burgues et al. 1994

No Brasil as espécies de *Fusarium* identificadas entre os anos 1993 e 1996 apresentam principalmente uma importância fitopatológica.

2.3.3. O Gênero *Aspergillus*

Aspergillus é um ascomiceto que está presente no ambiente e tem sido raramente relacionado a infecções oportunistas em seres humanos. A espécie *A. niger* é isolada em meios de cultura comumente utilizados em laboratório de microbiologia e é facilmente isolado a

partir de poeira e solo. *A. niger* é mais amplamente conhecido por seu papel como um grande produtor de ácido cítrico e em processos de fermentação (SCHUSTER, et al., 2002).

As enzimas produzidas por este fungo possuem grande importância na produção de enzimas alimentares. Segundo os estudos de Costa (1996), α -amilase pode ser alcançada em *Aspergillus* sp. com temperatura entre 30 e 37°C e na produção da amiloglucosidase *A. niger* a 30°C, útil na fermentação sólida .

Estes fungos são encontrados em diversos ambientes, mas é no solo que desempenham um papel importante no ciclo de carbono. Sendo um gênero saprófita, ou seja, decompositor de matéria orgânica, suas espécies são capazes de liberarem enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na degradação de lignina e celulose presentes nas plantas, promovendo a reciclagem e liberação de nutrientes, tornando um agente biológico importante no fluxo constante de massa e energia nos ecossistemas. Esta propriedade pode ser utilizada nas indústrias biotecnológicas para diversos fins ambientais (SPIER, 2005).

Aspergillus niger também é um importante organismo modelo para várias áreas de pesquisa incluindo o estudo da secreção de proteínas eucarióticas, os efeitos de vários fatores ambientais, melhoria na produção de biomassa de enzimas, mecanismos genéticos e moleculares no melhoramento da produção e biomassa enzimática e fermentação de ácido cítrico, e os mecanismos envolvidos no controle da morfologia de fungos. (Van den VONDERVOORT et al., 2004).

2.3.4. O Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* pertence à ordem *Eurotiales* e espécies que pertencem ao filo Ascomycota, são versáteis oportunistas e podem ser patógenos pós-colheita, causando deterioração em frutas e legumes. Como exemplo as espécies *P. italicum* e *P. digitatum* são patógenos mais comuns de frutas cítricas, enquanto que *P. expansum* é conhecida por atacar as

mações. Estas duas espécies crescem em temperaturas mais frias, fato que explica por que eles são normalmente encontrados em alimentos que são deixados muito tempo na geladeira. Muitas espécies produzem micotoxinas, por exemplo, espécies de *P. expansum* produzem uma toxina chamada patulina. Esta espécie é uma das mais agressivas e que sobrevivem por muito mais tempo mesmo sob condições adversas, sendo que o tratamento mais comum é a utilização de fungicida na produção pós-colheita (TOURNAS, 2005).

No entanto, o gênero *Penicillium* não é meramente um fungo prejudicial, muitas espécies são úteis como, por exemplo, o *P. roquefortii* que é utilizado na produção de queijos, cuja cor vem dos esporos (conídios) do fungo. Os esporos são injetados no queijo durante a fermentação para amadurecimento, cor e sabor. Outra espécie, *P. camambertii* é também utilizada com a mesma finalidade. Um dos fármacos muito utilizados e o primeiro antibiótico a ser usado em larga escala foi a penicilina, produzida pelo *P. notatum*, que foi descoberto na década de 1920 por Alexander Fleming. No entanto, ele foi substituído por *P. chrysogenum*, uma espécie mais produtiva que agora é a espécie utilizada na fabricação de penicilina. Dentro deste contexto, o gênero *Penicillium* é de grande importância biotecnológica para a indústria alimentícia e farmacêutica (BANCERZ, et al., 2005).

O gênero *Penicillium* também é reconhecido por produzir metabólitos secundários. Carlile et al. (2001) citam como um exemplo a ciclosporina em que os genes que codificam algumas das enzimas são encontrados em aglomerados em um único cromossomo. Esta evidência foi encontrada em *P. chrysogenum*, entre outros organismos, sendo que a localização desses genes sugere que um único cromossomo pode desempenhar um papel na expressão destes genes.

Com exceção da espécie *P. marneffei*, que é termicamente dimórfica, as outras espécies de *Penicillium* são filamentosas. Os conídios são redondos e unicelulares, glicanos são comuns nas paredes celulares destas espécies fúngicas. O *Penicillium* tende a ter hifas

pequenas, e este fato faz com que o movimento proplasmático seja difícil de detectar e também levam a um menor crescimento das zonas periféricas. Esporos apresentam uma superfície hidrofóbica que, quando molhadas, germinam. *Penicillium* são osmotolerantes, o que significa que embora eles cresçam melhor com altos níveis de água, eles são capazes de tolerar baixo potencial hídrico. Espécies de *Penicillium* se reproduzem assexuadamente e são capazes de esporular quando submersos. Sendo assim, o gênero *Penicillium* é um fungo de grande importância biotecnológica e é muito utilizado em laboratórios de microbiologia para estudos genéticos e enzimáticos devido à facilidade de crescimento e reprodução.

2.3.5. O Gênero *Phanerochaete*

Neste gênero, a espécie *P. chrysosporium* é um fungo que causa a podridão branca em madeiras devido à sua capacidade especializada para degradar a lignina. *P. chrysosporium* libera enzimas extracelulares que degradam a estrutura tridimensional complexa da lignina em componentes que podem ser utilizados pelo seu metabolismo. As enzimas extracelulares não são específicos agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila) usados para clivar as ligações de lignina (BURDSALL, 1974). Devido as habilidades de degradação especializadas do fungo *P. chrysosporium*, muitas pesquisas visam buscar maneiras de entender o mecanismo, a fim de melhorar a biorremediação de uma gama diversificada de poluentes. Portanto, *P. chrysosporium* é o primeiro basidiomiceto a ter seu genoma completo sequenciado (MARTINEZ, et al., 2004). Estes fungos apresentam um padrão interessante de hifas septadas, dando uma forte linha de defesa em situações adversas. A rede de hifas possui algumas ramificações e as extremidades dos clamidósporos possuem hifas, com paredes grossas e esporos, sendo que o conidióforo dá origem a um blastoconídio assexuado (NAKASONE, 1990).

A degradação da lignina e poluentes é possível graças à produção de enzimas extracelulares, tais como a lignina peroxidase e a manganês peroxidase, enzimas estas que participam na remediação de vários pesticidas, hidrocarbonetos poliaromáticos, PCB, TNT, tetracloreto de carbono e várias substâncias tóxicas ao ambiente. Pesquisas avançam na degradação da lignina, o que resultou em inúmeros produtos substituindo o anel de benzeno. Importantes catalisadores nestas reações são as enzimas fenol oxidases (TOSHIAKI, et al., 1982). O processo de decomposição da lignina é realizado por meio de reações de clivagem. Estas enzimas extracelulares liberam radicais livres para iniciar a quebra espontânea do fenil propano, este processo pode ocorrer como um metabolismo secundário ou na fase estacionária (BARCAÇA, 2008). *P. chrysosporium* pode sobreviver em temperaturas mais altas, mais especificamente 40°C podendo ser encontrados nas florestas que vão desde a América do Norte para as áreas da Europa e no Brasil (BURDSALL, 1985). A principal função que assume é a da degradação complexa da lignina a partir de várias árvores e plantas. Este processo reduz a lignina a moléculas menos complexas, mantendo o ciclo da decomposição das plantas.

A importância do *P. chrysosporium* não se dá só devido a biodegradação de substâncias químicas nocivas, por meio de enzimas extracelulares, mas também, por sua capacidade de purificar a celulose deixando-a com coloração branca e destacando-se na indústria de papel (BLANCHETTE, et al., 1987). Algumas limitações para o uso de *P. chrysosporium* na indústria incluem o fato de que a celulose é um produto de valor relativamente baixo e a manutenção dos fungos torna-se um processo caro, pois alguns fungos têm baixa taxa de crescimento e precisam de grandes lascas de madeira para mantê-los em crescimento e produzir enzimas (NAKASONE, 1990). Em algumas espécies apresenta uma íntima associação com os hospedeiros (BURGUES et al., 1994).

2.4. Fungos endofíticos e sua utilização nos ensaios com novos meios de cultura

Os fungos compreendem aproximadamente 72 mil espécies descritas, entretanto a verdadeira escala de diversidade de fungos é um debate aberto e recorrente (ARNOLD et al., 2000). Dentre as espécies fúngicas descritas estão os fungos endofíticos, termo este inicialmente utilizado por De Bary em 1866. Aplicado aos micro-organismos que vivem no interior de tecidos vegetais, encontrados colonizando órgãos e tecidos como folhas, ramos e raízes sem causar danos aparentes à planta hospedeira, bem como apresentando uma estreita relação mutualística entre eles. Eles são encontrados em todas as espécies vegetais analisadas até o momento (AZEVEDO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2001; AZEVEDO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2002; BALDANI et al., 2002; COUTINHO et al., 2002; ADACHI et al., 2002; TRIPLETT et al., 2003; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005; PIMENTEL, 2001).

O estudo de fungos endofíticos tem sido importante para se conhecer a base biológica da interação endófito-hospedeiro. Estes fungos são potencialmente vantajosos para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico (STIERLE et al., 1993; PEIXOTO-NETO et al., 2002), como vetores genéticos para a introdução de genes de interesse, tais como: genes de resistência a pragas em plantas hospedeiras (MURRAY et al., 1992), para o controle biológico de doenças, entre outras características (AZEVEDO, et al., 2000; AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO e ARAÚJO, 2007 e LACAVA et al., 2010).

2.5. Características das plantas utilizadas no presente trabalho para isolamento de fungos endofíticos

2.5.1. Oliveira

Trata-se da *Olea europaea* L., da família Oliaceae, pertencente a subfamília das *Oleóides*, a qual é dividida em duas tribos, das *Oleae* e das *Syringae*. A tribo *Oleae* possui

diversos gêneros, entre eles destaca-se o *Olea*. Este agrupa cerca de 35 espécies, incluindo a Oliveira (*Olea europea* L.). A espécie *Olea europea* L. ainda se divide em duas subespécies, uma cultivada (*Olea europea sativa*), e outra silvestre (*Olea europea sylvestris*) que normalmente é utilizado como porta enxerto para a cultivada (CRANCIO, 2002). A floração é abundante, porém formam-se somente de quatro a cinco frutos por infrutescência. Estes, conhecidos como azeitonas, são drupas típicas, globosas grandes ou pequenas e geralmente carnosas. Todas as partes contêm óleo, porém o mesocarpo (polpa) é a mais rica (CRANCIO, 2002).

A oliveira é uma planta perene, rústica, de muita longevidade, altura de até 20m, tronco ereto, com ramificações flexíveis e sem espinhos. Suas folhas são simples, opostas, o pecíolo é curto, com lâmina lanceolada, vilosa, verde-escura na face inferior. A inflorescência se apresenta em cacho ou panícula de forma, tamanho e cor variável, mesmo em um único indivíduo. Seu centro de origem é apontado como o Sul do Cáucaso e regiões do Irã, Palestina, Síria, Chipre até o Egito, na região dita como mesopotâmia.

No Brasil a cultura foi introduzida há vários séculos e em quase todos os estados do Brasil, porém o cultivo se concentrou nas regiões Sul e Sudeste (COUTINHO et al 2009). Segundo os mesmos autores, a produção do Brasil é ainda insuficiente tornando-o o quarto maior importador de azeitonas de mesa e o quinto de azeite de oliva. Oliveira (2001) justifica essa insuficiência dado que o país ainda não conseguiu estabelecer a olivicultura devido à deficiência no processo de produção que apresenta manejos inadequados e falta de conhecimento de técnicas de formação e condução dos pomares.

A importância econômica da Oliveira advém de seu consumo *in natura* (azeitona de mesa) e o seu óleo (azeite de oliva). Este último normalmente é bastante utilizado em substituição aos óleos de cozinha (soja, milho e girassol), principalmente na Europa. A Espanha é o maior produtor e exportador mundial destes produtos (SEBADELHE, 2008).

2.5.2. Guaraná

O Guaranazeiro (*Paullinia cupana*), pertence ao gênero *Paullinia*, subfamília Sapindoideae, próprio de espécies arbóreas nativas das regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, que comporta cerca de 200 espécies. A maioria das espécies é endêmica ao hemisfério ocidental, com exceção *P. pinnata* de ocorrência nos trópicos da América e África (POLO, 2006).

O guaranazeiro é uma planta nativa da região Amazônica, que produz o guaraná, fruto utilizado na culinária e na farmacologia. Trata-se de uma espécie arbustiva, com hábito de crescimento trepador o qual originou o nome da família, sapindáceas, que na língua indígena significa "varana", fazendo referência as árvores que sobem e apóiam em outras. Cultivado inicialmente na Amazônia pelos Índios Maués, atualmente o Brasil é o maior produtor de guaraná e da bebida refrigerante. Sua produção, além da Amazônia, ocorre em larga escala no estado da Bahia (FRAIFE FILHO e RAMOS, 2012).

Polo (2006), relata os aspectos econômicos da *P. cupana*, sendo o guaraná, a espécie de maior importância econômica dentre o gênero, devido a uma vasta e difundida utilidade. Sua utilização não é só na indústria alimentícia, mas também há relatos da utilização da espécie na medicina devido às suas propriedades antipiréticas, antinevrálgicas e antidiarréicas e estimulante, características já reconhecidas pelos colonizadores, como seu efeito analgésico comparável à aspirina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Padronizar um meio de cultura para fungos filamentosos tendo um tubérculo em substituição à batata como sua fonte principal, para utilização em laboratórios de micro-organismos e para o cultivo de fungos de maneira eficiente e econômica.

3.2. Objetivos Específicos

➤ Avaliar *Manihot esculenta* (mandioca), *Ipomoea batatas* (batata-doce), *Daucus carota* (cenoura), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Dioscorea alata* (cará), para possível utilização como meio de cultura, no cultivo de fungos em laboratórios de micro-organismos.

Escolher a mais apropriada após os testes preliminares;

➤ Avaliar o crescimento micelial e esporulação de importantes fungos de interesse biotecnológico como: *B. bassiana*, *A. niger*, *Penicillium* sp. *Fusarium* sp e *P. chrysosporium*, nos diferentes meios de cultivo;

➤ Isolar no meio de cultura que se revelar mais apropriado em experimentos prévios, e em seguida identificar por meio de sequenciamento dos genes ribossomais os fungos endofíticos presentes em folhas nas espécies arbóreas *Olea europea* (oliveira) e *Paullinia cupana* (guaraná), comparando-os com os obtidos no isolamento em meio tradicional de Batata Dextrose Ágar (BDA);

➤ Padronizar o meio de cultura apropriado para crescimento de fungos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética de Micro-organismos, Depto de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP e no Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana - UFAM/AM.

4.1. Escolha de material como substrato para meios de cultura

Os experimentos foram iniciados utilizando diferentes substratos, visto que estes foram escolhidos com base nas semelhanças e propriedades nutricionais com a batata, utilizada como controle no presente trabalho (Tabela 8).

Foram utilizadas três raízes tuberosas: mandioca (*Manihot esculenta*), batata-doce (*Ipomoea batatas*) e cenoura (*Daucus carota*) e três tubérculos: batata inglesa (*Solanum tuberosum*), gengibre (*Zingiber officinale*) e cará (*Dioscorea alata*). As espécies selecionadas seguiram alguns critérios: serem de preferência de origem tropical, disponibilidade no decorrer do ano e preço acessível, principalmente na região Norte do Brasil. A princípio todos os vegetais foram adquiridos em mercados escolhidos aleatoriamente na cidade de Piracicaba/SP. Para a segunda etapa do trabalho (padronização do meio Mandioca Dextrose Ágar - MDA), foi utilizado o cultivar BRS PURUS (DIAS, et al., 2003), cedido pela Embrapa Amazônia Ocidental/AM.

Tabela 8 - Composição média de 100g de matéria fresca de batata-doce, mandioca, cenoura, batata, cará e gengibre.

Componentes	Unidade	Quantidade					
		Batata-doce	Mandioca	Cenoura	Batata	Cará	Gengibre
umidade	%	70	63	88	78	72	78
carboidratos totais	g	26,1	32,4	11,0	18,5	23,1	17,7
proteínas	g	1,5	1,0	1,5	2,1	1,7	1,82
lipídios	g	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,7
cálcio	mg	32,0	39,0	45,0	9,0	35,0	16,0
fósforo	mg	39,0	41,0	40,0	50,0	65,0	34,0
ferro	mg	0,7	1,1	1,0	0,8	1,2	0,6
fibras digeríveis	g	3,9	4,4	1,1 - 2,4	2,1	4,0	2,0
energia	Kcal	111	141	51	80	103	80

Fonte: Cereda (2001).

4.2. Isolados fúngicos utilizados

Foram utilizados cinco isolados de fungos com potencial biotecnológico (Tabela 9), os quais foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Genética de Micro-organismos, Depto de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP. Eles foram utilizados para os testes de crescimento micelial e para esporulação.

Tabela 9 - Isolados de fungos utilizados no trabalho e seu valor biotecnológico.

Espécies fúngicas	Utilização biotecnológica
<i>Beauveria bassiana</i>	Entomopatogênico (controle biológico)
<i>Fusarium</i> sp.	Patógeno
<i>Aspergillus niger</i>	Produção de ácido cítrico
<i>Penicillium</i> sp.	Produção de metabólitos secundários
<i>Phanerochaete chrysosporum</i>	Degradação de lignina (biorremediação)

4.3. Preparo dos meios de cultura

4.3.1. Meio BDA (Batata Dextrose Ágar)

O meio de cultura BDA comercial (Difco) é composto de 20 g/L de dextrose, 4 g/L de extrato de batata e 15 g/L de ágar. Para o preparo de um litro do meio de cultura pesou-se 39g do composto dissolvido em água destilada sendo que o pH foi mantido em torno de 6,0 a 6,5. Este meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C a 1 atm antes de sua utilização.

4.3.2. Meio MDA (Mandioca Dextrose Ágar) e meios com outros substratos

Na primeira fase os meios alternativos ao BDA, cenoura (CDA), mandioca (MDA), gengibre (GDA), cará (CaDA) e batata-doce (BdDA), foram preparados no próprio laboratório seguindo o protocolo (artesanal) do meio BDA, (200g de Batata ; 20g de Dextrose; 15g de Ágar em 1 litro de água destilada, pH = 6,5). Foram substituídas as 200g de batata pelos outros tubérculos. Para a infusão dos meios, os vegetais foram cortados em fatias, adicionada água destilada e colocados à fervura durante 30 min. Este líquido foi coado, completado com 1L de água destilada e, à temperatura ambiente, adicionada dextrose e conferido o pH. Estes meios foram então autoclavados e plaqueados, e em seguida, inoculados os fungos a fim de se obter os resultados do crescimento e esporulação nos diferentes meios.

Em um segundo momento do trabalho foi selecionado o tubérculo mandioca como o meio (substrato) da pesquisa, para obtenção de uma padronização do mesmo. A mandioca então passou por uma etapa de liofilização. Neste processo, ela foi triturada em um liquidificador de cozinha, coada em um pano de algodão, alíquotada em sacos plásticos de 100 ml e submersas em nitrogênio líquido para o congelamento. Em seguida, foram levadas para o liofilizador a -50°C (E-C Micromodulyo acoplado a bomba de vácuo valuPump VLP80 Savant), até a retirada total de água do meio, em média de 3 a 4 dias. Após esta etapa, este

material foi levado ao moinho para obtenção do material em pó triturado para ser utilizado nos experimentos.

Para o preparo do meio de cultura sólido MDA liofilizado, diferentes concentrações (4, 10, 12, 14 e 16g) do pó de mandioca foram adicionadas (separadamente) a 20g de glicose e dissolvidos em um litro de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 15g de Ágar (seguindo o mesmo protocolo do BDA “vide bula” do meio comercial Difco). O pH foi ajustado para 6,5 e o meio de cultura esterilizado em autoclave por 20 minutos, a 121°C e 1 atm.

4.4. Análise do crescimento micelial e esporulação de fungos nos diferentes meios de cultura

Para os experimentos de verificação do crescimento radial do micélio e efeito sobre a esporulação dos fungos descritos na Tabela 9, os mesmos foram cultivados em placa de Petri contendo meio BDA (Difco) e mantidos a 28°C. Os meios de cultura foram preparados mantendo o mesmo protocolo de preparo do meio BDA, substituindo a batata pelos outros vegetais (protocolo descrito no item 4.3.2). Foram testados também os meios com ou sem a adição de dextrose. Com adição de dextrose foram acrescentados 20g/L ao meio, de acordo com a padronização como no meio de cultura BDA comercial. Para melhor avaliação do crescimento micelial as colônias foram medidas com uma régua milimetrada (mm) obedecendo a um intervalo de 24-24h e avaliado o crescimento de cada linhagem.

4.4.1. Crescimento radial em meios sólidos

Fragmentos de oito milímetros de diâmetro de colônias dos fungos *B. bassiana*, *A. niger*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp e *P. chrysosporum*, foram inoculados no centro de placas de Petri contendo os meios de mandioca, batata inglesa, batata-doce, cenoura, gengibre e cará

com e sem dextrose. Como controle foi utilizado o meio BDA comercial da Difco. Os fungos foram incubados à temperatura de 28°C para crescimento. Utilizou-se três repetições para avaliação do crescimento radial diário dos fungos, a cada 24 horas, até um dia antes do primeiro fungo atingir a colonização total da placa.

4.4.2. Esporulação dos fungos em meio sólido

Após o crescimento radial (Item 4.4.1), placas foram selecionadas e com o auxílio de um furador de 8mm de diâmetro, retirou-se discos contendo inóculos em três pontos nos meios de culturas avaliados, para obtenção dos conídios dos fungos *B. bassiana*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *P. chrysosporium* a fim de se realizar a contagem. Para contagem dos esporos das colônias, os discos foram removidos após oito dias e colocados em 10 ml de solução aquosa de Tween 80 a 0,1% (v/v), agitadas em vórtex e feita a contagem de esporos utilizando uma câmara de Neubauer (conídios/ml). Para melhor contagem dos esporos na câmara de Neubauer foram feitas diluições apropriadas para cada linhagem.

4.4.3. Crescimento dos fungos em meio líquido (peso seco)

Três discos (8 mm) da colônia fúngica foram retirados das bordas de colônias com aproximadamente 10 dias de crescimento e inoculados em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura BD (Batata Dextrose) e MD (Mandioca Dextrose) e mantidos a 28°C. Os micélios foram retirados após 3 e 6 dias, colocados em estufa de secagem a 60° C e avaliados após adquirirem peso seco constante.

4.4.4. Análises e Estatísticas do crescimento e esporulação dos fungos

A análise estatística de todos os dados foi realizada com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, considerando os

delineamentos experimentais como inteiramente casualizados. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$), de acordo com o Teste de Tukey.

4.5. Isolamento de fungos endofíticos

Para o isolamento de fungos endofíticos foram utilizadas duas espécies de plantas (Tabela 10). A oliveira, característica de regiões subtropicais e temperadas, e o guaranazeiro, da região Norte do Brasil.

Tabela 10 - Plantas utilizadas para o isolamento de fungos endofíticos.

Planta	Nome científico	Região
Oliveira	<i>Olea europea</i>	ESALQ / USP
Guaraná	<i>Paullinia cupana</i>	UFAM-AM

4.5.1. Método de isolamento de fungos endofíticos de folhas

Trinta folhas entre novas e velhas, das plantas de *O. europea* e *P. cupana* foram removidas dos galhos, armazenadas em sacos plásticos e transportadas imediatamente para o laboratório, onde foram lavadas em água corrente e utilizadas para os experimentos no máximo até 24 horas após sua coleta no campo. Os fungos endofíticos foram isolados das folhas sadias, aparentemente sem sintomas de doenças após a remoção dos micro-organismos epifíticos por meio de lavagens seriadas em etanol 70% por 1 min., solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl⁻) por 3 min., etanol 70% por 30 segundos e duas lavagens em água destilada esterilizada segundo metodologia descrita por Araújo et al. (2010) representado na Figura 1. A eficácia do processo de desinfestação superficial foi confirmada, semeando-se alíquotas da água da última lavagem em meio de cultura Batata Dextrose Ágar. Após a desinfestação superficial, as folhas foram cortadas em fragmentos de cerca de 5-7 milímetros de comprimento e largura e transferidas assepticamente (seis fragmentos/placa) para placas

contendo os dois meios de cultura (BDA e MDA) suplementados com tetraciclina ($50\mu\text{g/mL}^{-1}$) e estreptomicina ($50\mu\text{g/mL}^{-1}$), para impedir o crescimento de bactérias. Utilizou-se 34 placas por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C e observadas todos os dias durante 30 dias, de forma a isolar tanto os micro-organismos de crescimento rápido quanto os de crescimento lento.

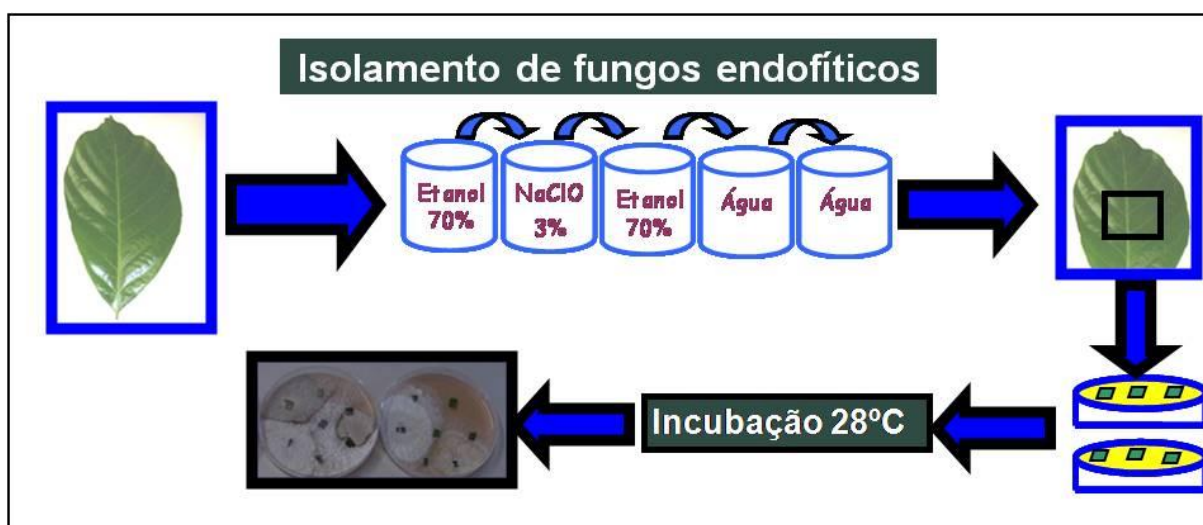


Figura 1- Esquema da técnica de isolamento de fungos endofíticos de folhas de *O. europea* e *P. cupana*.

4.5.2. Análise de variância dos fungos endofíticos isolados

A frequência de isolamento (FI) após o crescimento dos fungos foi calculada pela fórmula FI/N , onde FI=Número de fragmentos com fungos e N=número total de fragmentos. Esta frequência multiplicada por 100 é expressa em porcentagem. As colônias emergentes foram contadas, agrupadas por características morfológicas, purificadas e mantidas a 4°C para análises futuras.

4.5.3. Análises da diversidade de fungos endofíticos

4.5.3.1. Identificação Molecular

O DNA dos isolados fúngicos foi extraído de acordo com Raeder & Broda (1985). As regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA foram amplificadas pela técnica de PCR em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s, e uma extensão final a 72°C por 7min. Foram utilizados os primers ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais anelam em posições específicas do 18S e 28S do rDNA. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50µL, contendo Tampão 1x (50mM de KCl, 20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 3,7mM de MgCl₂, 1mM de dNTP, 0,05U.µL⁻¹ de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4µM de cada primer e 3ng de DNA. O fragmento amplificado foi observado após eletroforese em gel agarose 1,2% a 3 volts.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1 Kb (Fermentas). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados a partir de um protocolo que utiliza PEG 8000 (Polietileno Glicol) (2 g de acetato de sódio, 1,2 g de Mg Cl 2 x 6 H 2 O e 262,0 g de PEG, 49,2 g de acetato de sódio, 1,2 g de Mg Cl 2 x 6 H 2 O e 262,0 g de PEG 8000) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de agitação em vórtex e centrifugados por 15 minutos (10.000g). O sobrenadante foi removido e adicionados 100 µl de etanol 95 – 100%. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000g, foi removido o sobrenadante e os tubos foram secos em temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em água ultrapura autoclavada em um volume de 20 µl. Após este procedimento as amostras purificadas foram verificadas em gel 1,2% de agarose e quantificadas com DNA lambda com diferentes concentrações para a quantificação que foi

padronizada em 20 ng/μl e foram enviadas para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, Setor de Sequenciamento de DNA-Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo-USP.

Para a identificação dos isolados fúngicos, as sequências foram analisadas comparativamente por meio do NCBI via BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra a base de dados do GenBank, que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor escore de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados. Dessa forma, considerou-se as sequências que apresentaram os mais altos valores de similaridade. Foram considerados os isolados fúngicos em nível de gênero.

4.5.3.2. Diversidade dos fungos endofíticos e construção da Árvore Filogenética

A árvore filogenética foi construída com base nas regiões ITS do rDNA obtidas no sequenciamento. Para o alinhamento, edição e construção das árvores foi utilizado o programa MEGA versão 4.1 (KUMAR et al., 2004). O agrupamento foi calculado de acordo com o método de Neighbor-Joining (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes e Cantor (KUMAR et al., 2004). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) através da base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Crescimento micelial

Na etapa inicial do trabalho foram avaliados os substratos, batata-doce, cará, gengibre, cenoura, batata e mandioca com e sem a adição de dextrose, comparando o crescimento micelial de cinco diferentes fungos filamentosos de importância biotecnológica: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Beauveria bassiana* e *Phanerochaete chrysosporium*. O meio de mandioca com glicose demonstrou um melhor crescimento micelial e se destacou como um meio alternativo que proporcionou o melhor crescimento das cinco linhagens de fungos utilizadas neste experimento (Figura 2 e 3 (a-e)). Dos onze meios analisados, o MDA foi o que apresentou melhor crescimento micelial para *A. niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *B. bassiana* e *P. chrysosporium*. Também os meios CaDA e BdDA foram tão eficientes como o MDA em relação ao crescimento de *A. niger* e *B. bassiana*. O BdDA comportou-se equivalente ao MDA em relação ao crescimento de *Penicillium* sp. Também os meios BdDA, CaA e CaDA foram eficientes para o crescimento micelial de *B. bassiana* e *P. chrysosporium*. O meio BDA só apresentou resultados equivalentes a MDA quanto ao crescimento de *B. bassiana*.

Evidentemente houve diferença no crescimento dos cinco fungos utilizados, o que é inerente ao próprio desenvolvimento destas espécies, pois o crescimento de *B. bassiana* e *Penicillium* sp. usado é inferior ao de fungos de crescimento mais rápido como *A. niger*, *P. chrysosporium* e *Fusarium* sp.

Os resultados demonstraram que o substrato de escolha com relação ao crescimento micelial em meio sólido foi a mandioca. Entretanto, para estudos futuros os meios cará e batata-doce são alternativas de interesse. É também interessante a composição entre carboidratos totais e umidade presentes nos diferentes substratos e sua possível correlação com o crescimento micelial. A mandioca, a batata-doce e o cará apresentam menor umidade e

maior quantidade de carboidratos por 100g de matéria seca comparado a cenoura, a batata e o gengibre (Tabela 8). E estes podem ser fatores que colaboraram para melhor crescimento nos primeiros substratos em relação aos últimos.

Como esperado, os meios com dextrose, em geral, superaram os meios com substratos sem dextrose, mas algumas pequenas exceções foram notadas, por exemplo o meio com cará sem dextrose superou ao cará dextrose em relação ao crescimento de *Fusarium* sp. (Figura 3c) Também deve ser salientado que os meios de cultura com e sem dextrose foram sempre comparados com o meio batata contendo dextrose. E em alguns casos os meios, mesmo sem dextrose, se igualaram ao BDA como ocorreu com a batata-doce no crescimento de *A. niger* (Figura 3a). Isto é esperado devido à quantidade de açúcares já presente na batata-doce. Além do mais, para o preparo do meio de cultura de forma artesanal, o meio de mandioca deverá ser mais apropriado pelo fato desta ser uma cultura que praticamente não exige fungicida e outros agrotóxicos para manter o controle de pragas e doenças. Ao contrário, o meio BDA quando preparado com batatas de procedência desconhecida pode conter fungicidas e outros defensivos químicos que alteram negativamente o crescimento de fungos, como tem ocorrido em diversos laboratórios que trabalham com micologia.

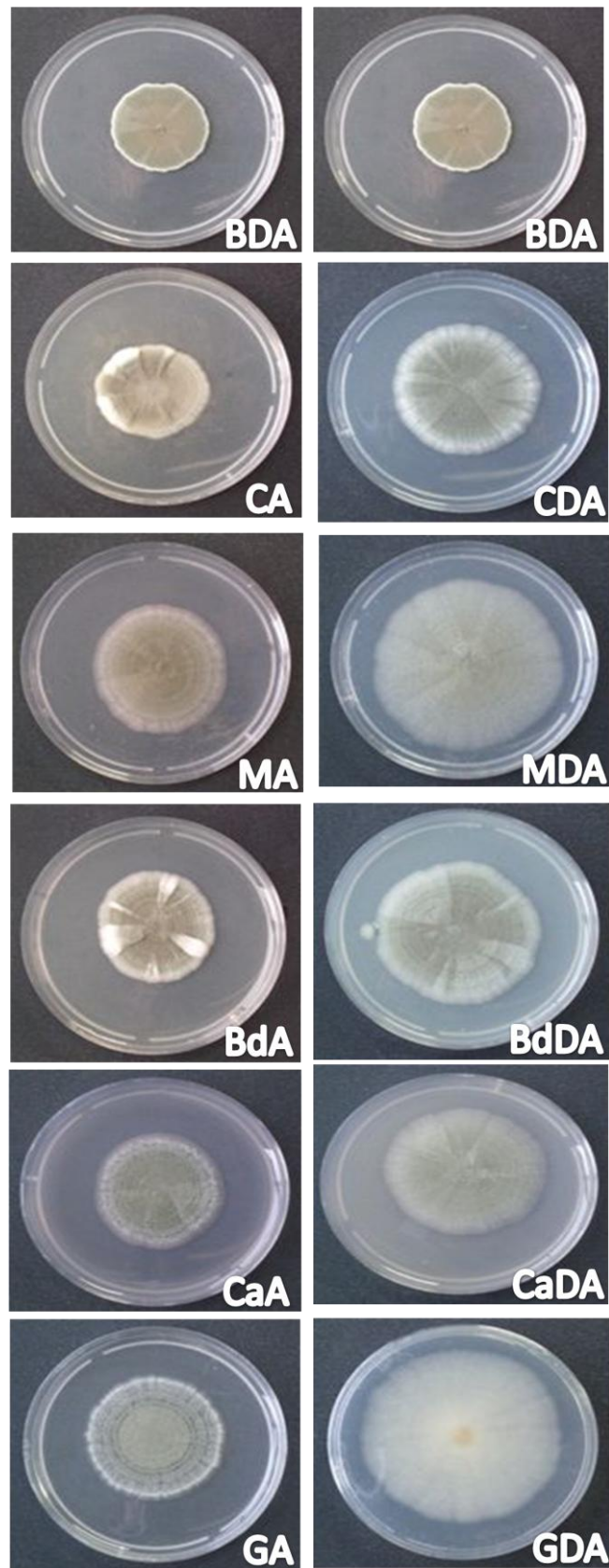


Figura 2- Exemplo da morfologia de colônias de um fungo utilizado (*Penicillium* sp.), em diferentes meios de cultura: Batata Dextrose Ágar (BDA), Cenoura Ágar (CA), Cenoura Dextrose Ágar (CDA), Mandioca Ágar (MA), Mandioca Dextrose Ágar (MDA), Batata-doce Ágar (BdA), Batata-doce Dextrose Ágar (BdDA), Cará Ágar (CaA), Cará Dextrose Ágar (CaDA), Gengibre Ágar (GA), Gengibre Dextrose Ágar (GDA).

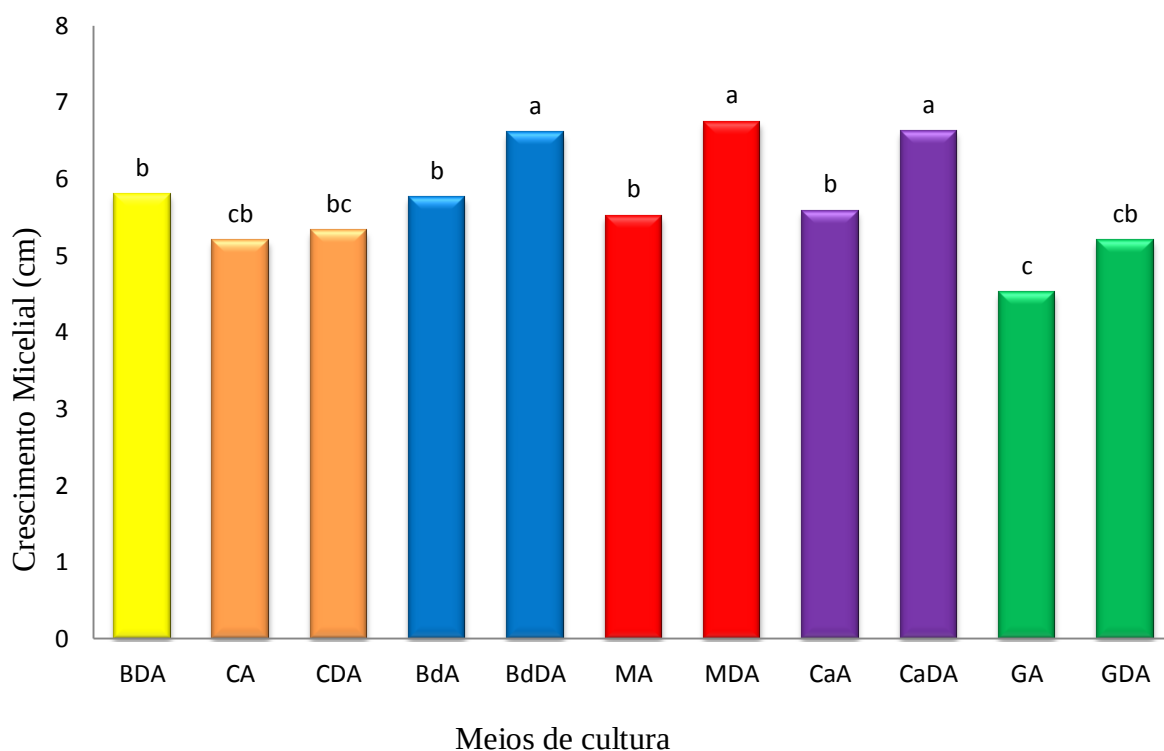


Figura 3-a - Perfil de crescimento micelial de *Aspergillus niger* nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

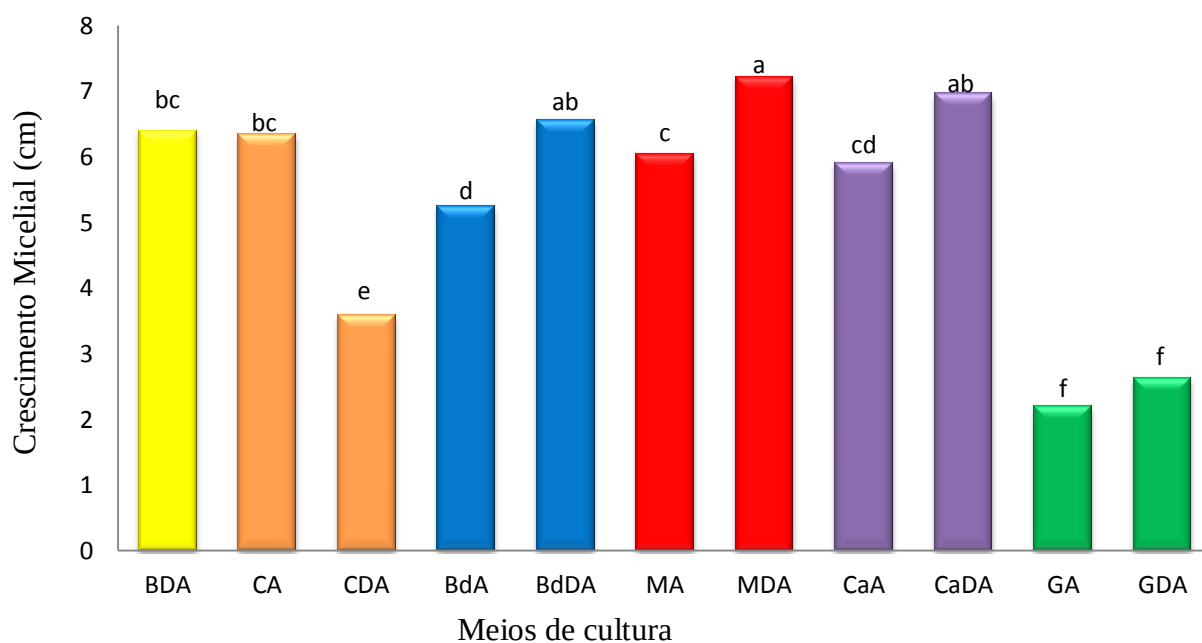


Figura 3-b - Perfil de crescimento micelial de *Panerochaete chrysosporium* nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

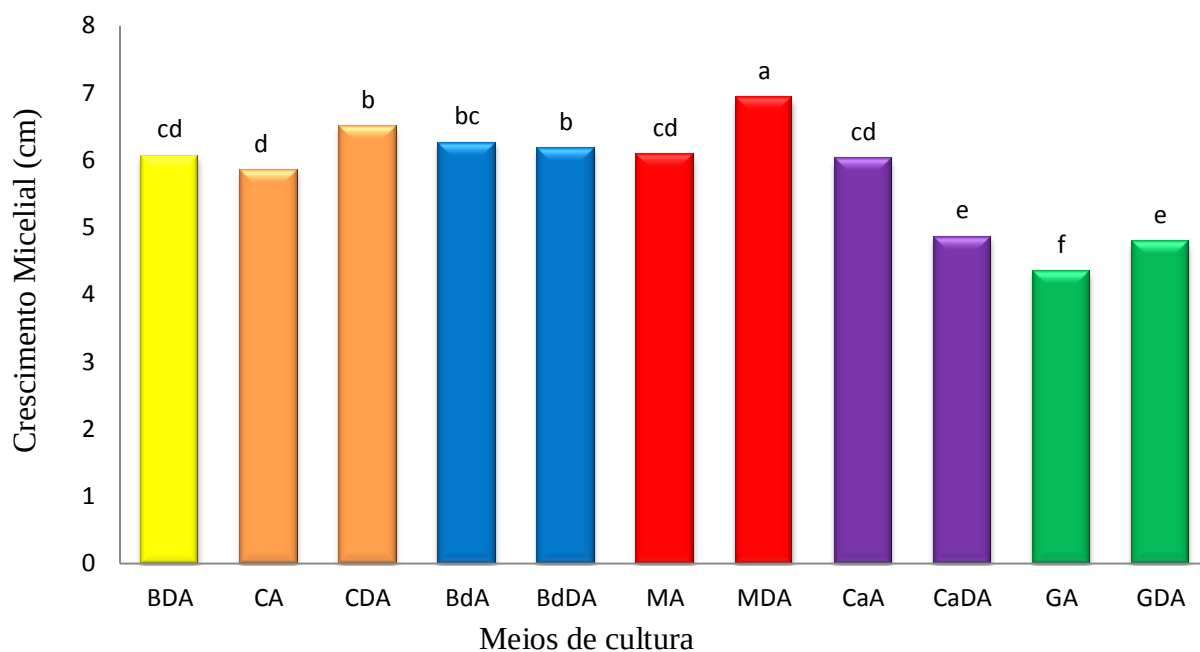


Figura 3-c - Perfil de crescimento micelial de *Fusarium* sp. nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

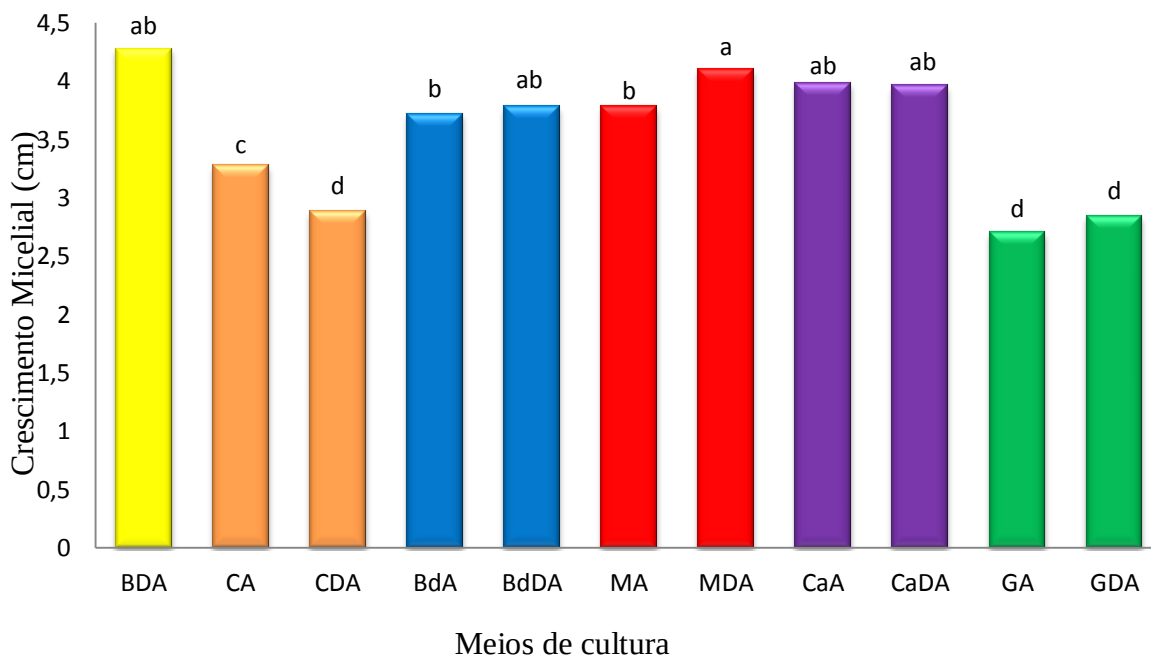


Figura 3-d - Perfil de crescimento micelial de *Beauveria bassiana* nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

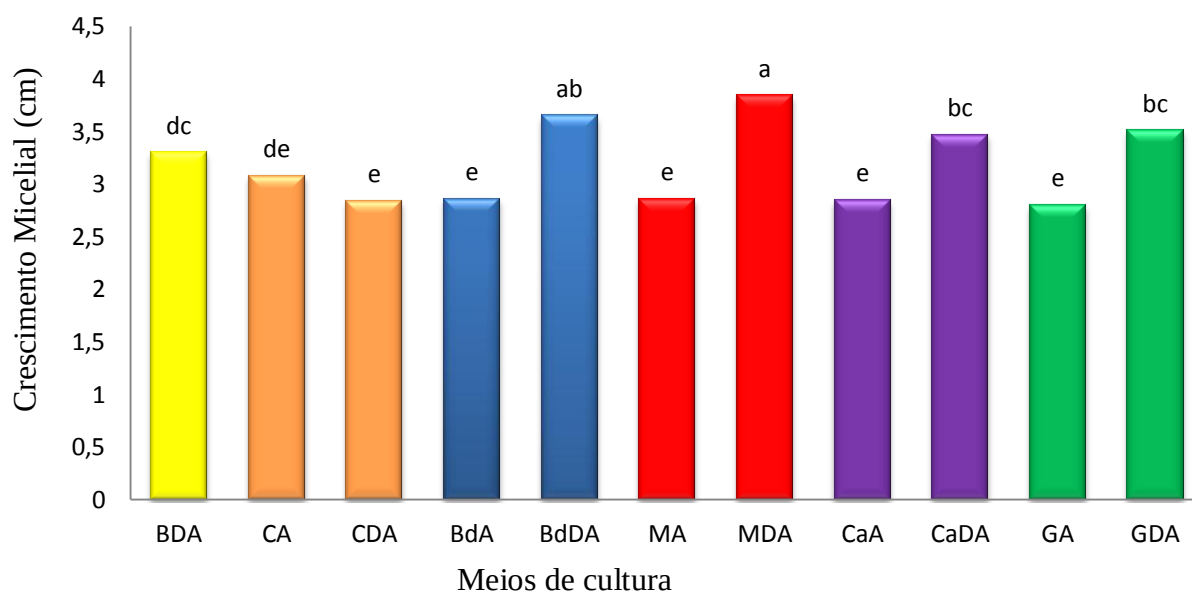


Figura 3-e - Perfil de crescimento micelial de *Penicillium* sp. nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5.2. Contagem de esporos: esporulação

Após a avaliação do crescimento micelial foi estudada a esporulação das cinco linhagens de fungos. Os resultados estão apresentados na figura 4 (a-e). O fungo *Penicillium* sp. foi o que apresentou melhor esporulação nos meios utilizados (cerca de $3,6 \times 10^6$ conídios/ml para o meio BDA, por exemplo); este gênero possui esporos pequenos e grande capacidade de esporular em diferentes fontes de carbono, diferentemente dos outros gêneros analisados (Figura 4e).

Na análise estatística da produção de esporos, o meio de cenoura foi o que apresentou resultado mais satisfatório em comparação com o restante dos outros substratos avaliados. Entretanto, a mandioca foi escolhida para a continuidade da pesquisa como citado acima, pois os fungos analisados tiveram um crescimento micelial mais favorável quando comparados com o BDA. Considerando que para a região Norte a mandioca possui menor preço de mercado e disponibilidade, ela continua sendo a melhor opção em relação à cenoura e aos outros substratos.

Com relação a esporulação, o meio BDA seguido do meio de cenoura com ou sem dextrose, em alguns casos, mostrou-se superior aos demais meios inclusive ao de mandioca com ou sem dextrose. Esse resultado já era esperado, pois a esporulação é uma das formas de resistência de fungos a condições de estresses. Em meios nos quais o crescimento radial é melhor, evidentemente um fungo terá menor necessidade de esporulação para resistir a efeitos adversos. Uma vez que o crescimento radial foi maior em meio com mandioca era de se esperar que a esporulação fosse menor como de fato ocorreu (Figura 4 a-e). Entretanto, alterações na composição dos meios podem melhorar a condição dos mesmos, dando foco para melhor esporulação e menor crescimento, de acordo com o que se busca em uma pesquisa básica ou aplicada com um fungo filamentoso.

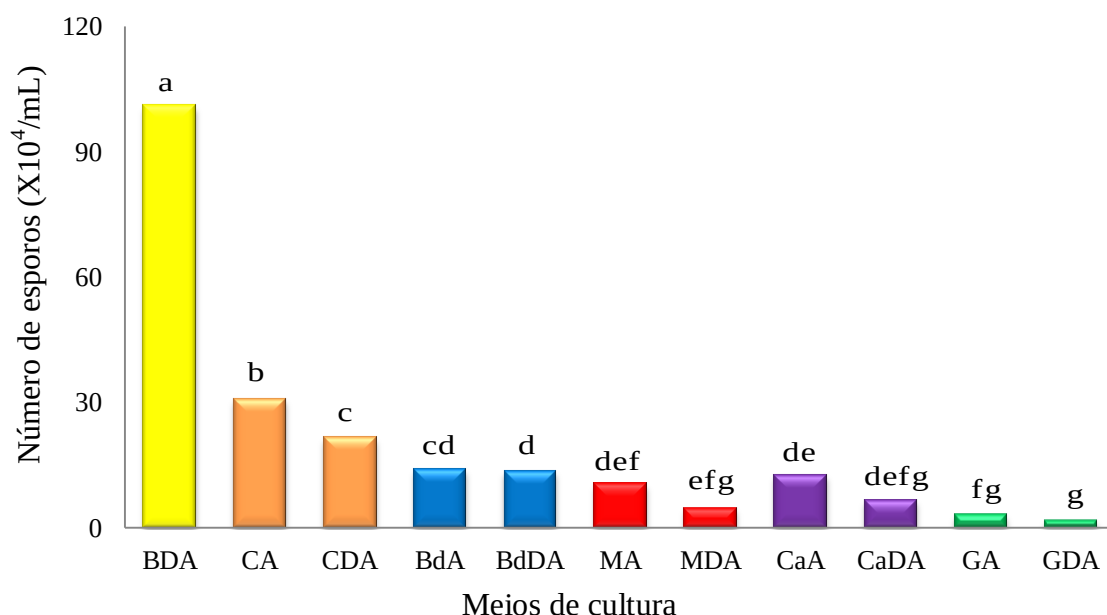


Figura 4a - Perfil da contagem do número de esporos de *Aspergillus niger* nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

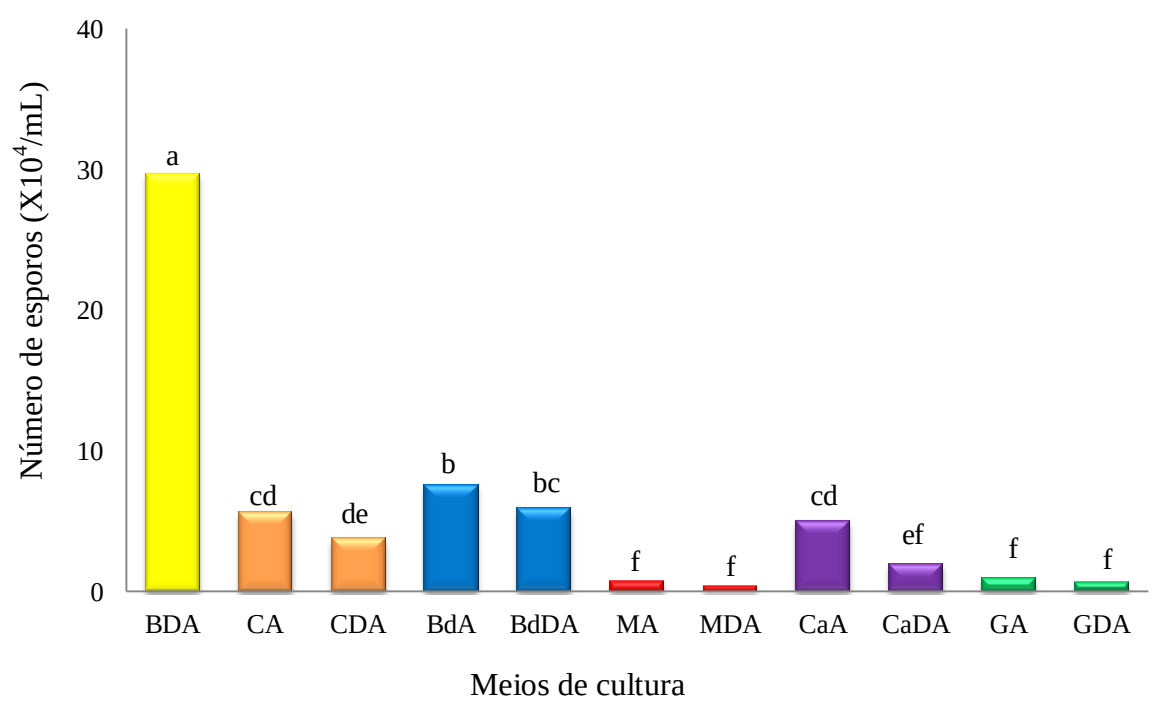


Figura 4b - Perfil da contagem do número de esporos de *Phanerochaete chrysosporium* nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

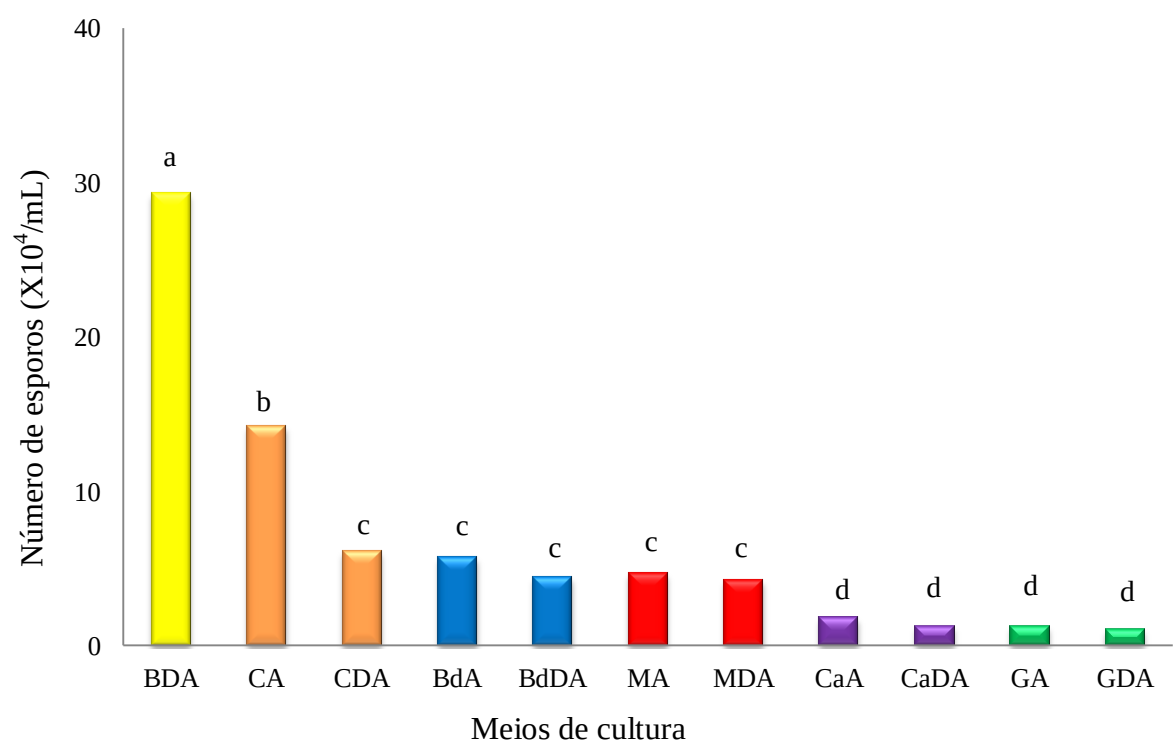


Figura 4c -. Perfil da contagem do número de esporos de *Fusarium* sp. nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

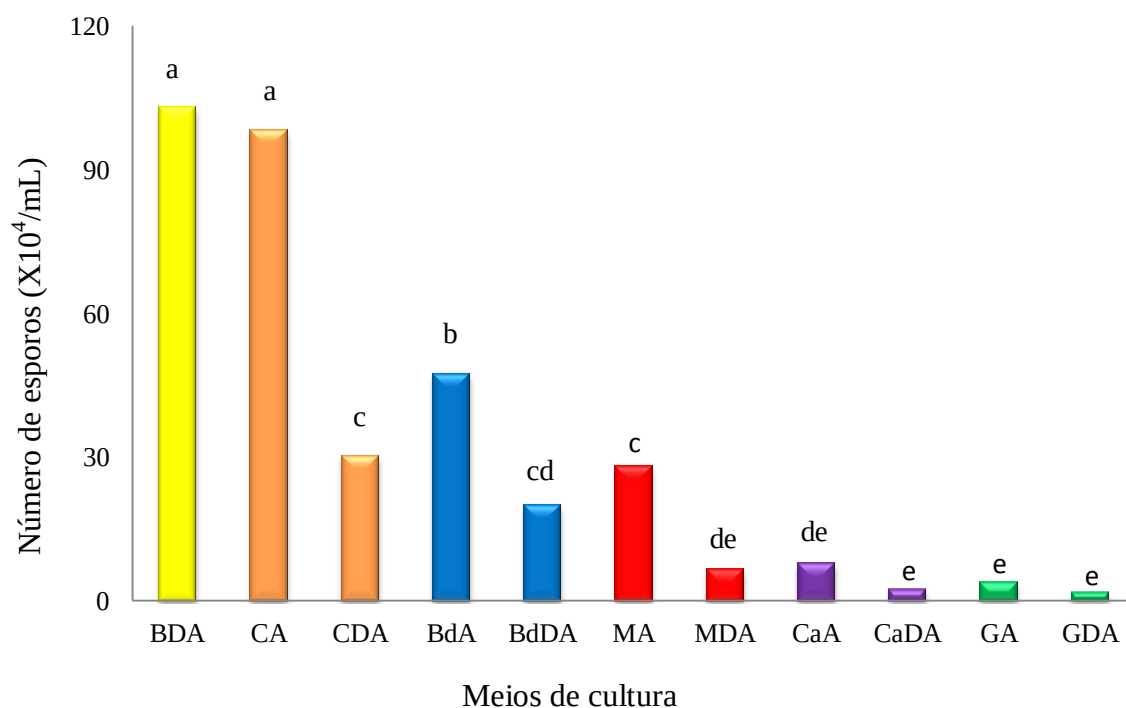


Figura 4d - Perfil da contagem do número de esporos de *Beauveria bassiana* nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

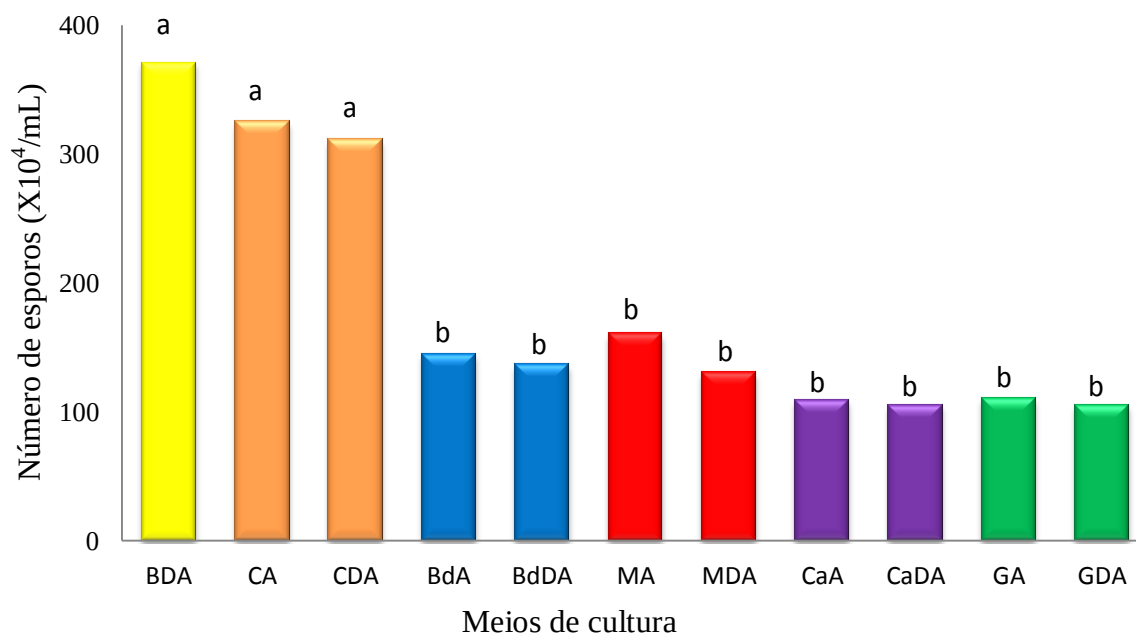


Figura 4e - Perfil da contagem do número de esporos de *Penicillium* sp. nos diferentes meios de cultura. As mesmas letras indicam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5.3. Padronização do meio Mandioca Dextrose Ágar (MDA)

Uma vez estabelecido pelos testes de crescimento micelial em meio sólido que o MDA era o mais apropriado substituto em relação ao BDA, procurou-se padronizar o meio MDA alternando as concentrações de substrato (4, 10, 12, 14 e 16g gramas de pó liofilizado), descrito no Item 4.3.2. E assim ter um melhor parâmetro para avaliar o crescimento, a esporulação e o peso seco do micélio das linhagens de fungos avaliadas no trabalho.

Para verificar o melhor crescimento dos isolados em meio MDA (Figura 5 e Tabela 11) os fungos já utilizados nos itens anteriores (Tabela 9) foram avaliados. Verificou-se que em todas as concentrações o meio MDA obteve melhor desempenho no crescimento em relação ao meio de cultura BDA, que contém 4g de infusão de batata para 1 litro (informação do fabricante). Foi observado que a esporulação dos fungos em MDA em todas as concentrações analisadas foram abaixo da obtida em meio BDA o que demonstrou que o MDA, mesmo com a mesma quantidade, não apresentou o mesmo desempenho que o BDA (Tabela 12). Portanto, foi escolhido manter a concentração de 14g para o trabalho, pois houve um aumento estatisticamente significativo em relação ao crescimento micelial (Tabela 11). Ressalta-se ainda que as demais concentrações também apresentaram diferenças significativas, entretanto com níveis menores de crescimento micelial. Foi observado também que a partir de MDA 14g não houve necessidade de utilizar mais substrato de mandioca o que encareceria o produto. Outro fator é que na concentração de 16g, a solubilidade deste substrato o torna inviável na prática laboratorial, uma vez que aumentando a sua quantidade, dificulta o preparo deste meio de cultura.

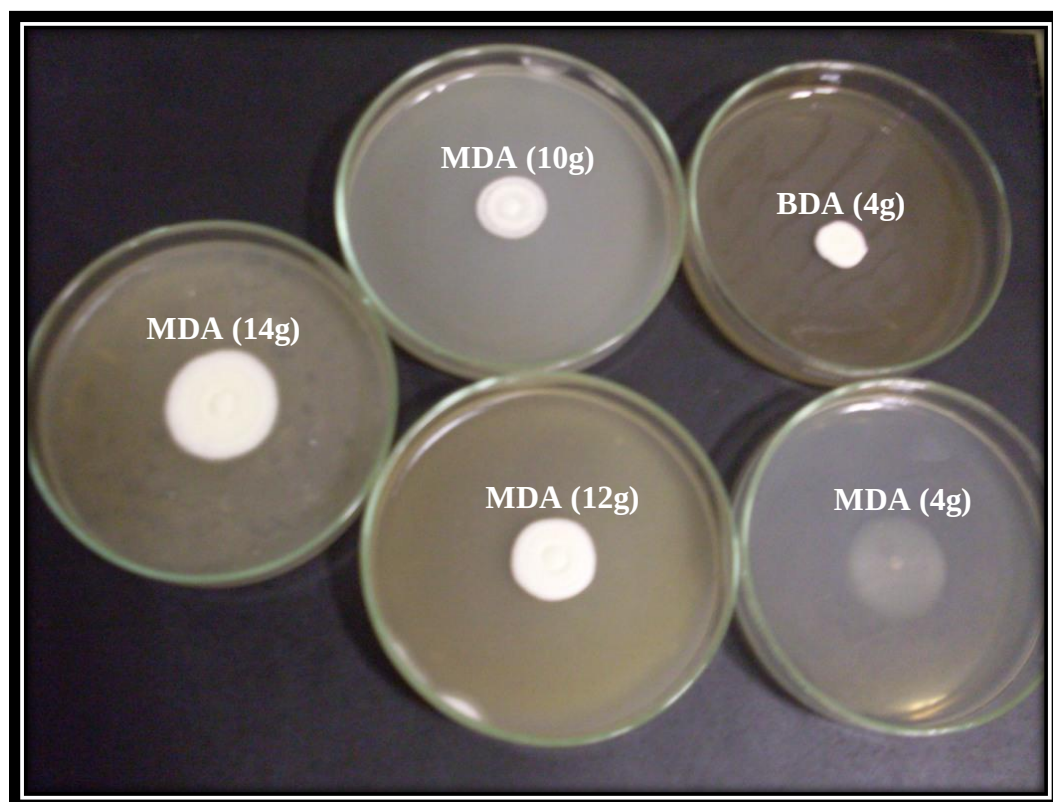


Figura 5- Exemplo de crescimento micelial de um fungo utilizado (*Beauveria bassiana*) em 4, 10, 12 e 14 gramas (substrato de mandioca, MDA).

Tabela 11 - Crescimento micelial dos fungos em meio BDA e em diferentes concentrações de substrato de mandioca. Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey, letras iguais indicam diferenças não significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Fungos	BDA	MDA4g	MDA10g	MDA12g	MDA14g	MDA16g
<i>A. niger</i>	2,62500 ^d	3,07500 ^c	3,40000 ^b	3,50000 ^{ab}	3,62500 ^a	3,71300 ^a
<i>Penicilium</i> sp.	1,12500 ^d	1,35000 ^c	1,52500 ^b	1,70000 ^a	1,80000 ^a	1,90500 ^a
<i>Fusarium</i> sp.	2,22500 ^d	2,65000 ^c	2,87500 ^b	2,97500 ^{ab}	3,07500 ^a	3,19800 ^a
<i>P.chrysosporium</i>	3,32500 ^c	3,4500 ^{bc}	3,72500 ^a	3,82500 ^a	3,90000 ^a	3,90600 ^a
<i>B. bassiana</i>	1,12500 ^d	1,35000 ^c	1,52500 ^b	1,70000 ^a	1,80000 ^a	1,90300 ^a

Tabela 12 - Esporulação dos fungos em meio BDA e em diferentes concentrações de substrato de mandioca. Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey, letras iguais indicam diferenças não significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Fungos	BDA	MDA4g	MDA10g	MDA12g	MDA14g	MDA16g
<i>A. niger</i>	129,75 ^a	50 ^b	52 ^b	57,75 ^b	58,25 ^b	59,00 ^b
<i>Penicilium</i> sp.	216 ^a	86,75 ^b	88,05 ^b	88,25 ^b	89,5 ^b	89,8 ^b
<i>Fusarium</i> sp.	57,25 ^a	10,5 ^b	10,75 ^b	10,5 ^b	11,25 ^b	11,3 ^b
<i>P.chrysosporium</i>	110 ^a	36,75 ^b	37 ^b	39,25 ^b	45,75 ^b	45,90 ^b
<i>B. bassiana</i>	149,75 ^a	35 ^b	36,5 ^b	37 ^b	38,5 ^b	38,9 ^b

5.4. Avaliação do peso seco do micélio

Esta avaliação de peso seco do micélio em meio MD líquido contendo 14 gramas de substrato de mandioca foi realizada para confirmar o que já havia demonstrado no crescimento micelial, quando se avaliou a quantidade de substrato (Tabela11). Este meio alternativo foi melhor que o meio BD líquido (Tabela 13), sendo assim, o meio MD pode ser utilizado substituindo o meio BD para crescimento de fungos filamentosos a fim de se obter maiores quantidades de massa micelial.

Tabela 13 - Peso seco dos fungos em meio BD e na concentração de 14g de substrato de mandioca. Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey, letras iguais indicam diferenças não significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Fungos	BD (4g)	MD(14g)
<i>A. niger</i>	0,149067 ^b	0,203111 ^a
<i>Penicilium</i> sp.	0,1388 ^b	0,237244 ^a
<i>Fusarium</i> sp.	0,111144 ^b	0,185689 ^a
<i>P.chrysosporium</i>	0,13741 ^b	0,22714 ^a
<i>B. bassiana</i>	0,1099 ^b	0,255844 ^a

Os dados indicaram mais uma vez que o meio de mandioca foi bem superior para obtenção de massa micelial. Estes dados são de extrema importância quando se pretende obter massa micelial em fungos e para a produção de compostos de valor biotecnológico.

5.5. Avaliação da mandioca brava x mandioca mansa

As cultivares de mandioca são normalmente classificadas em doces e amargas de acordo com o teor de ácido cianídrico (HCN) contido em suas raízes. As doces são comumente utilizadas para consumo in natura. As amargas, conhecidas como mandioca brava, são, em geral, mais resistentes a pragas e possuem maior produtividade. Diante disso, há uma preferência do uso desta variedade como matéria-prima na indústria (FUKUDA et al., 2006). A mandioca brava foi escolhida para a padronização do experimento e pelo fato desta cultivar ter uma maior quantidade de ácido cianídrico em sua polpa, levantou-se a hipótese deste influenciar nos resultados de crescimento, esporulação e peso seco dos isolados. Para isto foi realizado um experimento com todos os fungos dos experimentos anteriores, comparando a mandioca brava e a mandioca mansa (de mesa). Para a demonstração foi escolhido o fungo *P. chrysosporium*, principalmente por ser um fungo largamente empregado em processos industriais na produção de enzimas lignocelulolíticas.

Foi observado que não ocorreu diferença significativa em relação ao crescimento micelial, esporulação, e peso seco entre a mandioca brava e a mansa (Tabelas 14 e 15) nos meios MDA.

Do ponto de vista econômico e social, o substrato de mandioca pode ser considerado uma alternativa de alta potencialidade na obtenção de meios de cultura para laboratórios de micologia, especialmente em países tropicais.

Tabela 14 - Crescimento micelial e esporulação do fungo *Panerochaete chrysosporium* em meio BDA e em diferentes concentrações de MDA com duas variedades de mandioca. Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre os resultados ($P \leq 0,05$).

Crescimento Micelial (cm)				
	4 g	10 g	12 g	14 g
BDA	2,4 ^c	-	-	-
Mandioca Brava	2,65 ^b	2,72 ^b	2,75 ^b	2,975 ^a
Mandioca Mansa	2,6 ^b	2,7 ^b	2,79 ^b	2,965 ^a

Esporulação				
	4 g	10 g	12 g	14 g
BDA	110 ^a	-	-	-
Mandioca Brava	36 ^b	40 ^b	37,25 ^b	45,75 ^b
Mandioca Mansa	38,2 ^b	39,5 ^b	39,52 ^b	44,25 ^b

Tabela 15 - Peso seco micelial do fungo *Panerochaete chrysosporium* em meio BD na concentração de 14g de MD entre duas variedades de mandioca. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre os resultados ($P \leq 0,05$).

Meios de cultura	Peso seco (g)
BD	0,15163 b
MD Mansa	0,24207 a
MD Brava	0,23307 a

5.6. Isolamento de fungos endofíticos em meio MDA e BDA

De acordo com a metodologia de isolamento foi possível isolar fungos endofíticos em ambos os meios (Figura 6). No meio BDA, utilizando folhas sadias do guaranazeiro obteve-se uma porcentagem de 81% de fragmentos com fungos (FI=81%). Já em MDA a porcentagem atingiu 96% (FI=96%). Em se tratando da oliveira, no meio BDA os valores foram 31% (FI=31%) de fragmentos com fungos e 40% em MDA (FI=40%).

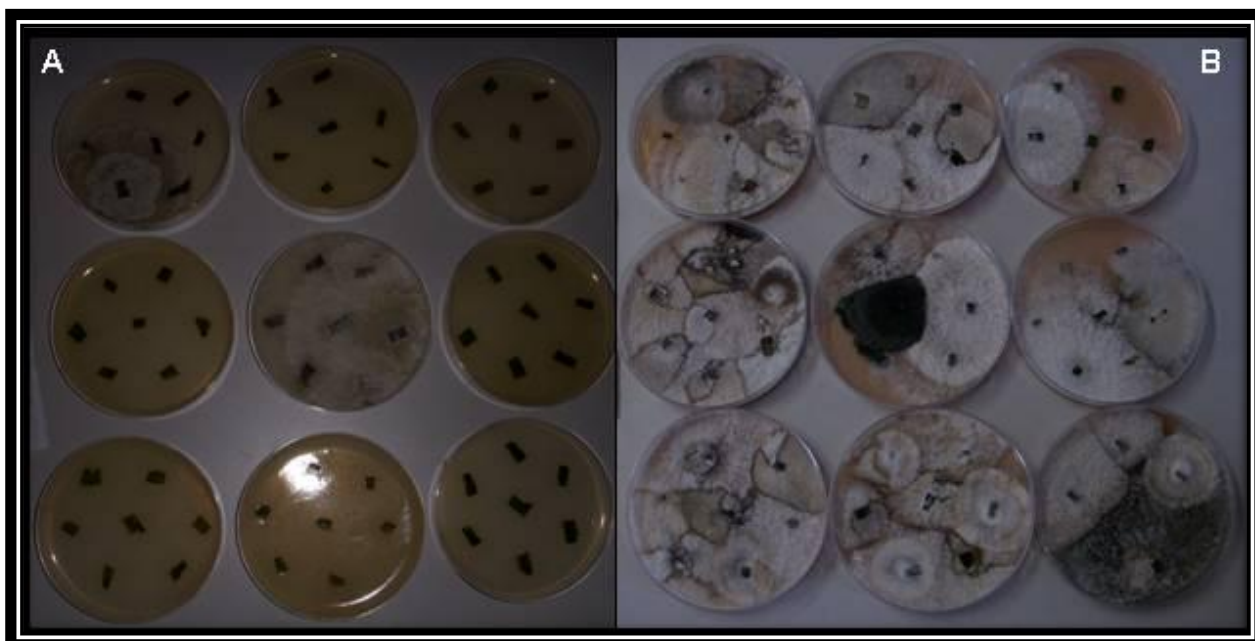


Figura 6 - A) Exemplo do crescimento de fungos endofíticos a partir de fragmentos de folhas de oliveira em meio BDA e MDA e B) Crescimento de fungos endofíticos da planta de guaraná em meio BDA e MDA.

5.7. Diversidade de fungos endofíticos isolados em MDA e BDA de duas espécies vegetais

De acordo com a metodologia citada no Item 4.5 foram isolados fungos endofíticos obtidos da planta do guaraná e oliveira em meio MDA e BDA. Após a extração de DNA estes foram quantificados para ser utilizados na reação da PCR. A Figura 7 demonstra que a metodologia utilizada foi suficiente para obter DNA de qualidade e posterior análise molecular.

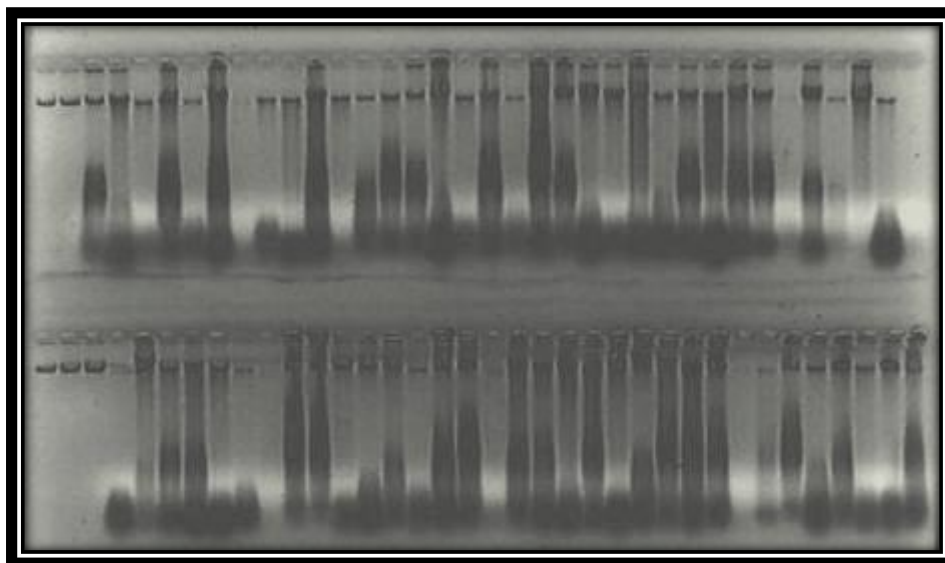


Figura 7 - Extração de DNA total dos isolados de plantas de guaraná e oliveira. As primeiras canaletas de ambos os géis representam marcadores moleculares referentes a 25, 50 e 100 ng/μl, respectivamente.

A partir do DNA dos isolados extraídos, foi realizada a reação de PCR com os *primers* ITS1 e ITS4 onde foram obtidos fragmentos de 550 a 600pb (Figura 8). Estes fragmentos foram purificados e sequenciados, o que gerou a identificação dos isolados das duas plantas analisadas.

Por meio da base de dados do site NCBI foi possível a identificação dos isolados, pelo menos em nível de gênero e, em alguns casos, obteve-se similaridade de 100% em nível de espécie. A classificação taxonômica molecular de fungos é complexa para afirmar com segurança um isolado em nível de espécie, sendo necessário a utilização de outras ferramentas. Assim a discussão sobre a diversidade fúngica avaliada nestas plantas foi realizada em nível de gênero e família.

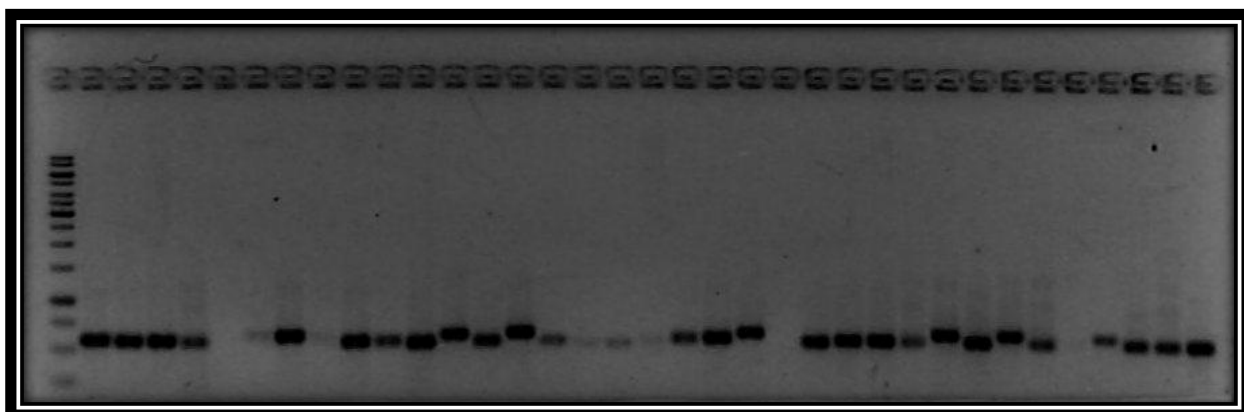


Figura 8 - Amplificação do gene ribossomal ITS1 e ITS4 de isolados endofíticos de planta de guaraná e oliveira. As bandas observadas possuem aproximadamente 550-600pb, conforme esperado. A primeira canaleta foi carregada com marcador 1Kb.

O sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi realizado para identificar, avaliar a diversidade e filogenia entre os isolados. Foram sequenciados 63 isolados de guaraná sendo 29 no meio BDA e 34 no meio MDA e 53 isolados de oliveira sendo 26 no meio BDA e 27 no meio MDA (Tabela 16).

Em se tratando da planta do guaraná, dos 29 isolados em BDA, apenas 7 gêneros foram encontrados, em contrapartida no meio MDA foram encontrados 15 gêneros (Tabela 17).

Tabela 16 – Identificação molecular de fungos otidos de oliveira e guaraná pelo seqüenciamento da região ITS do rDNA.

Isolados	Planta	Meio de cultura isolamento	Fungos	Porcentagem de identidade
GBDA1	Guaraná	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	95%
GBDA2	Guaraná	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	97%
GBDA3	Guaraná	BDA	<i>Xylaria</i> sp.	97%
GBDA4	Guaraná	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	97%
GBDA5	Guaraná	BDA	<i>Coniosporium</i> sp.	93%
GBDA6	Guaraná	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	97%
GBDA7	Guaraná	BDA	<i>Colletotrichum</i> sp.	99%
GBDA8	Guaraná	BDA	<i>Diaporthe</i> sp.	98%
GBDA9	Guaraná	BDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99%
GBDA10	Guaraná	BDA	<i>Xylaria</i> sp.	96%
GBDA11	Guaraná	BDA	<i>Xylaria</i> sp.	99%
GBDA12	Guaraná	BDA	<i>Diaporthe</i> sp.	97%
GBDA13	Guaraná	BDA	<i>Diaporthe</i> sp.	97%
GBDA14	Guaraná	BDA	<i>Xylaria venosula</i>	99%
GBDA15	Guaraná	BDA	<i>Xylaria</i> sp.	88%
GBDA16	Guaraná	BDA	<i>Colletotrichum</i> sp.	96%
GBDA17	Guaraná	BDA	<i>Colletotrichum fruticola</i>	100%
GBDA18	Guaraná	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	98%
GBDA19	Guaraná	BDA	<i>Xylaria venosula</i>	99%
GBDA20	Guaraná	BDA	<i>Xylaria</i> sp.	99%
GBDA21	Guaraná	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
GBDA22	Guaraná	BDA	<i>Xylaria venosula</i>	97%
GBDA23	Guaraná	BDA	<i>Botryospheria mamane</i>	98%
GBDA24	Guaraná	BDA	<i>Xylaria</i> sp.	95%
GBDA25	Guaraná	BDA	<i>Xylaria</i> sp.	96%
GBDA26	Guaraná	BDA	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	98%
GBDA27	Guaraná	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
GBDA28	Guaraná	BDA	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
GBDA30	Guaraná	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	96%
GMDA1	Guaraná	MDA	<i>Coniosporium</i> sp.	92%
GMDA2	Guaraná	MDA	<i>Diaporthe</i> sp.	98%
GMDA4	Guaraná	MDA	<i>Guignardia mangiferae</i>	99%
GMDA5	Guaraná	MDA	<i>Diaporthe</i> sp.	95%
GMDA6	Guaraná	MDA	<i>Diaporthe</i> sp.	97%
GMDA7	Guaraná	MDA	<i>Guignardia mangiferae</i>	95%
GMDA8	Guaraná	MDA	<i>Colletotrichum fruticola</i>	97%
GMDA9	Guaraná	MDA	<i>Guignardia mangiferae</i>	99%
GMDA10	Guaraná	MDA	<i>Cochliobolus verruculosus</i>	98%
GMDA11	Guaraná	MDA	<i>Coniosporium</i> sp.	95%
GMDA12	Guaraná	MDA	<i>Colletotrichum fruticola</i>	97%
GMDA13	Guaraná	MDA	<i>Diaporthe</i> sp.	93%
GMDA14	Guaraná	MDA	<i>Diaporthe</i> sp.	98%
GMDA15	Guaraná	MDA	<i>Guignardia mangiferae</i>	99%
GMDA16	Guaraná	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	93%
GMDA17	Guaraná	MDA	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99%
GMDA18	Guaraná	MDA	<i>Phanerochaete sordida</i>	97%
GMDA19	Guaraná	MDA	<i>Guignardia mangiferae</i>	98%
GMDA20	Guaraná	MDA	<i>Guignardia mangiferae</i>	89%
GMDA21	Guaraná	MDA	<i>Ascomycota</i> sp.	99%
GMDA22	Guaraná	MDA	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	99%
GMDA23	Guaraná	MDA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98%

Tabela 16 - Identificação molecular de fungos otidos de oliveira e guaraná pelo seqüenciamento da região ITS do rDNA (Continuação...).

GMDA24	Guaraná	MDA	<i>Colletotrichum boninense</i>	99%
GMDA25	Guaraná	MDA	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	98%
GMDA26	Guaraná	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
GMDA27	Guaraná	MDA	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	99%
GMDA28	Guaraná	MDA	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	99%
GMDA29	Guaraná	MDA	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	96%
GMDA30	Guaraná	MDA	<i>Cochliobolus verruculosus</i>	98%
GMDA31	Guaraná	MDA	<i>Bionectria ochroleuca</i>	98%
GMDA32	Guaraná	MDA	<i>Xylaria grammica</i>	97%
GMDA33	Guaraná	MDA	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	93%
GMDA34	Guaraná	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	98%
GMDA35	Guaraná	MDA	<i>Guignardia mangiferae</i>	99%
OL-BDA1	Oliveira	BDA	<i>Guignardia mangiferae</i>	96%
OL-BDA2	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis phoenicicola</i>	99%
OL-BDA3	Oliveira	BDA	<i>Xylaria hypoxyla</i>	89%
OL-BDA4	Oliveira	BDA	<i>Xylaria</i> sp.	98%
OL-BDA5	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-BDA6	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis phoenicicol</i>	99%
OL-BDA7	Oliveira	BDA	<i>Daldinia concentrica</i>	93%
OL-BDA8	Oliveira	BDA	<i>Nigrospora</i> sp.	97%
OL-BDA9	Oliveira	BDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	97%
OL-BDA10	Oliveira	BDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	98%
OL-BDA11	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	95%
OL-BDA12	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	98%
OL-BDA13	Oliveira	BDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	98%
OL-BDA14	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	100%
OL-BDA15	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	98%
OL-BDA16	Oliveira	BDA	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
OL-BDA17	Oliveira	BDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	97%
OL-BDA18	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	89%
OL-BDA19	Oliveira	BDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	97%
OL-BDA20	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-BDA21	Oliveira	BDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	97%
OL-BDA22	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-BDA23	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	96%
OL-BDA24	Oliveira	BDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	98%
OL-BDA25	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-BDA26	Oliveira	BDA	<i>Phomopsis</i> sp.	98%
OL-MDA1	Oliveira	MDA	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
OL-MDA2	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	98%
OL-MDA3	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis chimonanthi</i>	97%
OL-MDA4	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	98%
OL-MDA5	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	96%
OL-MDA6	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	100%
OL-MDA7	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99%
OL-MDA8	Oliveira	MDA	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99%
OL-MDA9	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis phyllanthicola</i>	100%
OL-MDA10	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99%
OL-MDA11	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-MDA12	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-MDA13	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-MDA14	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	98%
OL-MDA15	Oliveira	MDA	<i>Xylaria</i> sp.	99%

Tabela 16 - Identificação molecular de fungos otidos de oliveira e guaraná pelo seqüenciamento da região ITS do rDNA (Final).

OL-MDA16	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-MDA17	Oliveira	MDA	<i>Xylaria</i> sp.	97%
OL-MDA18	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	98%
OL-MDA19	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	96%
OL-MDA20	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	97%
OL-MDA21	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	99%
OL-MDA22	Oliveira	MDA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%
OL-MDA23	Oliveira	MDA	<i>Diaporthe</i> sp.	93%
OL-MDA24	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis asparagi</i>	93%
OL-MDA25	Oliveira	MDA	<i>Diaporthales</i> sp.	97%
OL-MDA26	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	97%
OL-MDA27	Oliveira	MDA	<i>Phomopsis</i> sp.	96%

Dentro dos gêneros isolados, *Coniosporium*, *Phanerochaete* e *Bionectria* de acordo com a literatura e segundo nosso conhecimento não foram ainda encontrados como endófitos de plantas tropicais. Alguns fungos endofíticos de interesse foram isolados no guaraná como o gênero *Colletotrichum*, que possui espécies reconhecidamente patogênicas para essa planta. Como o isolamento foi realizado com plantas saudáveis, é possível que esses isolados de *Colletotrichum* sejam endofíticos e não patogênicos, que poderiam ser utilizados competindo com patógenos em um mecanismo de controle biológico. Também é possível que esses endófitos sejam hipovirulentos por conter partículas de RNA fita dupla como ocorre em outros fungos não patogênicos ou hipovirulentos (FIGUEIREDO et al., 2012). Alguns fungos encontrados como *Cladosporium* e *Phanerochaete* são utilizados do ponto de vista biotecnológico na produção de enzimas (FERRAZ, 2010) e na degradação de poluentes como plástico (ESPOSITO e SILVA, 2010) respectivamente.

Tabela 17 - Gêneros de fungos endofíticos encontrados nas plantas de guaraná e oliveira.

Classificação taxonômica	Guaraná		Oliveira	
	BDA	MDA	BDA	MDA
Ascomycota (filo)	0	1	0	0
<i>Aspergillus</i>	0	1	0	1
<i>Bionectria</i>	0	1	0	0
<i>Botryosphaeria</i>	1	1	0	0
<i>Cladosporium</i>	0	2	0	0
<i>Cochliobolus</i>	0	2	0	0
<i>Colletotrichum</i>	4	3	1	2
<i>Coniosporium</i>	1	2	0	0
<i>Daldinia</i>	0	0	1	0
Diaporthales (Ordem)	0	0	0	1
<i>Diaporthe</i>	4	5	7	10
<i>Guignardia</i>	0	7	1	0
<i>Lasiodiplodia</i>	1	1	0	0
<i>Nigrospora</i>	0	0	1	0
<i>Pestalotiopsis</i>	0	3	0	0
<i>Phanerochaete</i>	0	1	0	0
<i>Phomopsis</i>	8	3	13	11
<i>Xylaria</i>	10	1	2	2
Total:	29	34	26	27

Para a planta de oliveira foi observado que o meio MDA foi praticamente igual em relação ao número de fungos isolados em BDA. Vale ressaltar que no meio MDA foi possível isolar fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Xylaria* que não foram isolados no meio BDA, bem como os gêneros *Guignardia* e *Daldinia* que só foram isolados de oliveira, mas todos em pequeno número.

O objetivo do isolamento de endofíticos de uma planta tropical e uma de clima temperado foi verificar se entre os meios BDA e MDA havia alguma diferença que favorecesse um ou outro meio. No caso da planta do guaraná houve uma diferença significativa em favor do MDA, não só em relação ao número de gêneros, mas também em relação a gêneros possivelmente ainda não descritos como endófitos. Já para oliveira, uma planta de clima temperado, essas diferenças não foram acentuadas.

5.7.1. Caracterização filogenética dos fungos endofíticos isolados das plantas de guaraná e oliveira

Os alinhamentos para construção da árvore filogenética foram realizados com as sequências de maior identidade encontradas no NCBI. A filogenia gerada demonstrou a presença de uma rica comunidade de fungos endofíticos associados à planta de guaraná (Figura 9). Foram encontrados representantes de famílias diferentes, sendo a maioria do filo Ascomycota e apenas um gênero do filo Basidiomycota. Alguns dos isolados demonstraram alta similaridade com sequências de gêneros comumente encontrados como endófitos em plantas de climas tropicais, como *Cladosporium*, *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis* e *Xylaria* (ARNOLD et al., 2000; SURYANARAYANAN et al., 2003; SANTAMARIA e BAYMAN, 2005; AZEVEDO e ARAUJO, 2007). A espécie de *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae), que é reportada como endófito de muitas espécies vegetais (BAAYEN et al., 2002), foi isolada somente em plantas de guaraná em meio MDA, sendo 7 isolados das espécies *Mangiferae fruticola*.

Dentro do táxon do fungo *Diaporthe* da família Diaporthaceae resultaram dois clados diferentes dentro da árvore e que podem estar relacionados com sequências de DNA distintas, pertencentes a espécies diferentes uma vez que a maioria dos isolados são *Diaporthe* ou *Phomopsis* sp. Como este fungo possui duas fases (perfeita e imperfeita) também pode ocorrer uma relação destas fases, o que pode explicar a divisão do clado. Já outro clado foi formado por *Xylaria* e os isolados GMDA28, GMDA29 e GMDA22 se agruparam neste táxon, mas pertencem ao gênero *Pestalotiopsis* da família Amphisphaeriaceae e ordem Xylariales. O que pode ser observado é que independente do hospedeiro os isolados se agruparam de acordo com cada táxon baseado em ordem, família e gênero. Dentro dos gêneros *Colletotrichum* e *Guignardia* foram formados dois grupos distintos dentro da árvore filogenética. A partir da construção da árvore foi possível afirmar que a comunidade de fungos endófitos do guaraná é

formada por diferentes gêneros do filo Ascomycota e estes se agruparam nas respectivas famílias sendo que as famílias Diaporthaceae, Valsaceae, Glomerellaceae, Xylariaceae e Botryosphaeriaceae continham a maioria dos fungos endofíticos isolados.

Já para a oliveira foi gerada uma árvore filogenética (Figura 10) onde os táxons foram agrupados em um grande clado representado pelas famílias Diaporthaceae e Valsaceae dos dois gêneros *Diaporthe* *Phomopsis*, mas este clado foi subdividido em pequenos grupos com espécies diferentes mesmo porque a grande maioria dos isolados foi identificada apenas pelo gênero e que podem representar ser espécies diferentes ou até novas. Estes dois gêneros *Diaporthe* e *Phomopsis* não mostraram correlação em relação ao meio de cultura avaliado mesmo porque dentro da árvore se agruparam muitas vezes no mesmo clado, independente do meio de cultura onde foram isolados.

Dentro da árvore que representa a diversidade dos isolados de oliveira podem ser observadas mais três famílias distintas que agruparam os seus respectivos gêneros como a família Botryosphaeriaceae (*Guinardia*), Glomerellaceae (*Colletotrichum*) e Xylariaceae (*Xylaria*). A comunidade de fungos endofíticos de oliveira apresentou uma diversidade menor em relação à planta de guaraná, mas quando comparamos os isolados dos gêneros *Diaporthe* e *Phomopsis* sp., houve uma diversidade maior em relação às sequências de DNA que agruparam em pequenos táxons separadamente. Pode ser sugerido que este hospedeiro possui uma comunidade geneticamente específica em relação ao outro hospedeiro, uma vez que a planta de guaraná também possui isolados representativos destas duas famílias. Dentro deste contexto, existe uma relação específica entre os fungos deste gênero com o hospedeiro, pois alguns gêneros não foram relacionados com espécie, sendo apenas descritos como sp. Este fato pode sugerir que existem espécies novas que não obtiveram similaridade no banco de dados onde as sequências foram analisadas.

A comunidade de fungos endofíticos avaliada neste trabalho nas plantas (guaraná e oliveira) demonstrou que são muito particulares dentro de cada hospedeiro e que possivelmente ocorre uma interação entre hospedeiro e fungos endofíticos que é observada na formação dos táxons e na diversidade dentro de cada gênero observados na árvore filogenética.

Para avaliar com mais confiabilidade a diversidade, as sequências obtidas foram separadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) pelo programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009). Neste tipo de análise pode-se observar a separação das sequências de acordo com sua origem (Figura 11). De acordo com esta análise, observou-se que somente 4 sequências são comuns para as 2 plantas analisadas, ou seja, os isolados obtidos tendem a estar adaptados ao hospedeiro (planta) em questão, o que é esperado no caso dos micro-organismos endofíticos. Para a planta do guaraná, um total de 63 sequências foram obtidas e 65% delas representam UTOs únicas. Já para oliveira, apesar de ter-se obtido 53 sequências, houve pouca diferença quanto ao número de sequências, apenas 43% destas representam UTOs únicas. Assim, sugere-se que a comunidade de fungos endofíticos associados à planta do guaraná é mais diversa que a comunidade associada à oliveira.

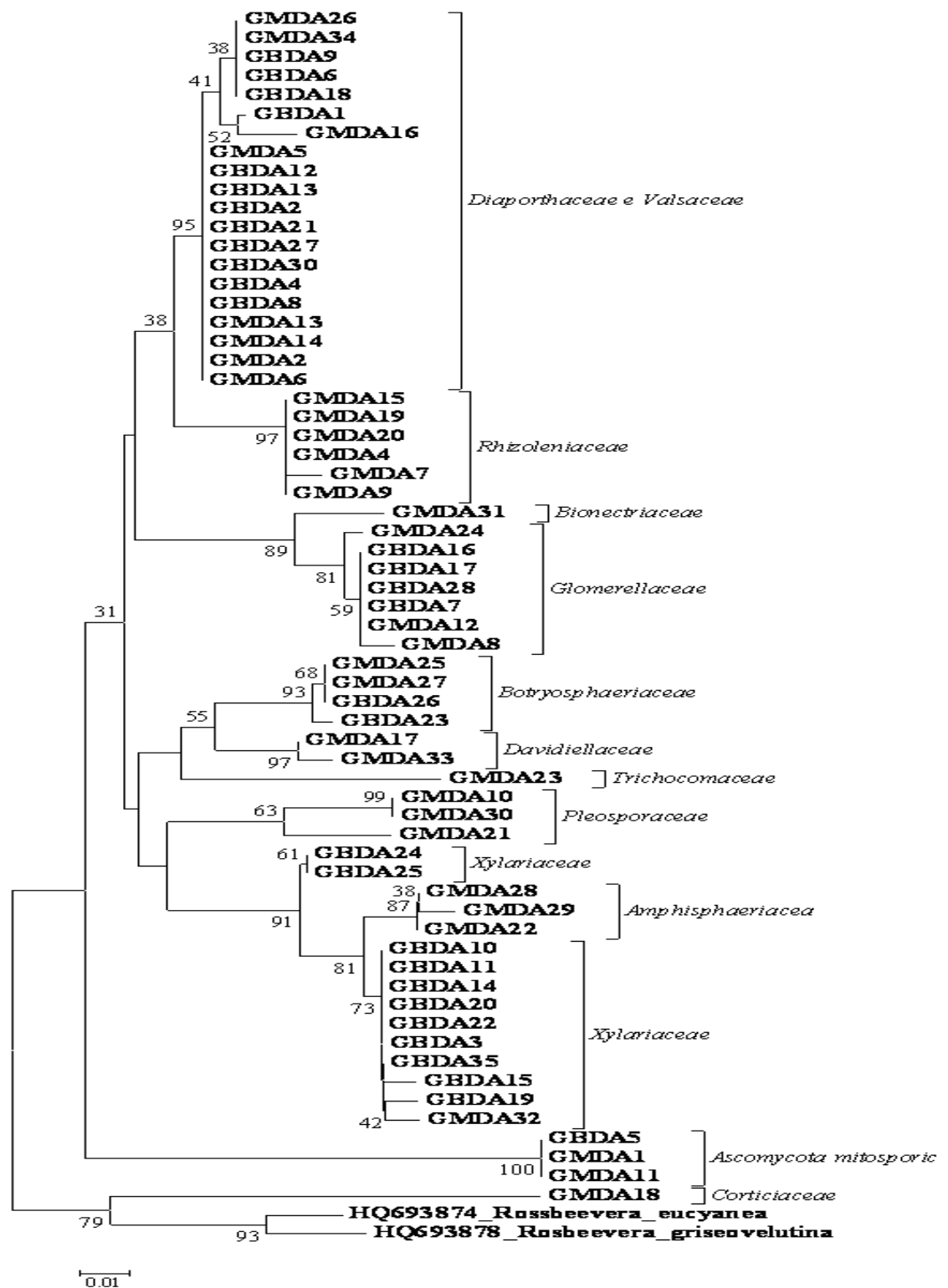


Figura 9 - Análise filogenética formada por isolados referentes à planta de guaraná. A filogenia foi realizada pelo programa Mega5 baseada na comparação de seqüências de cerca de 500pb do gene 16S rRNA com seqüências disponíveis nos bancos de dados. Os agrupamentos foram calculados com o método muscle, e os dados nos ramos indicam valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações.

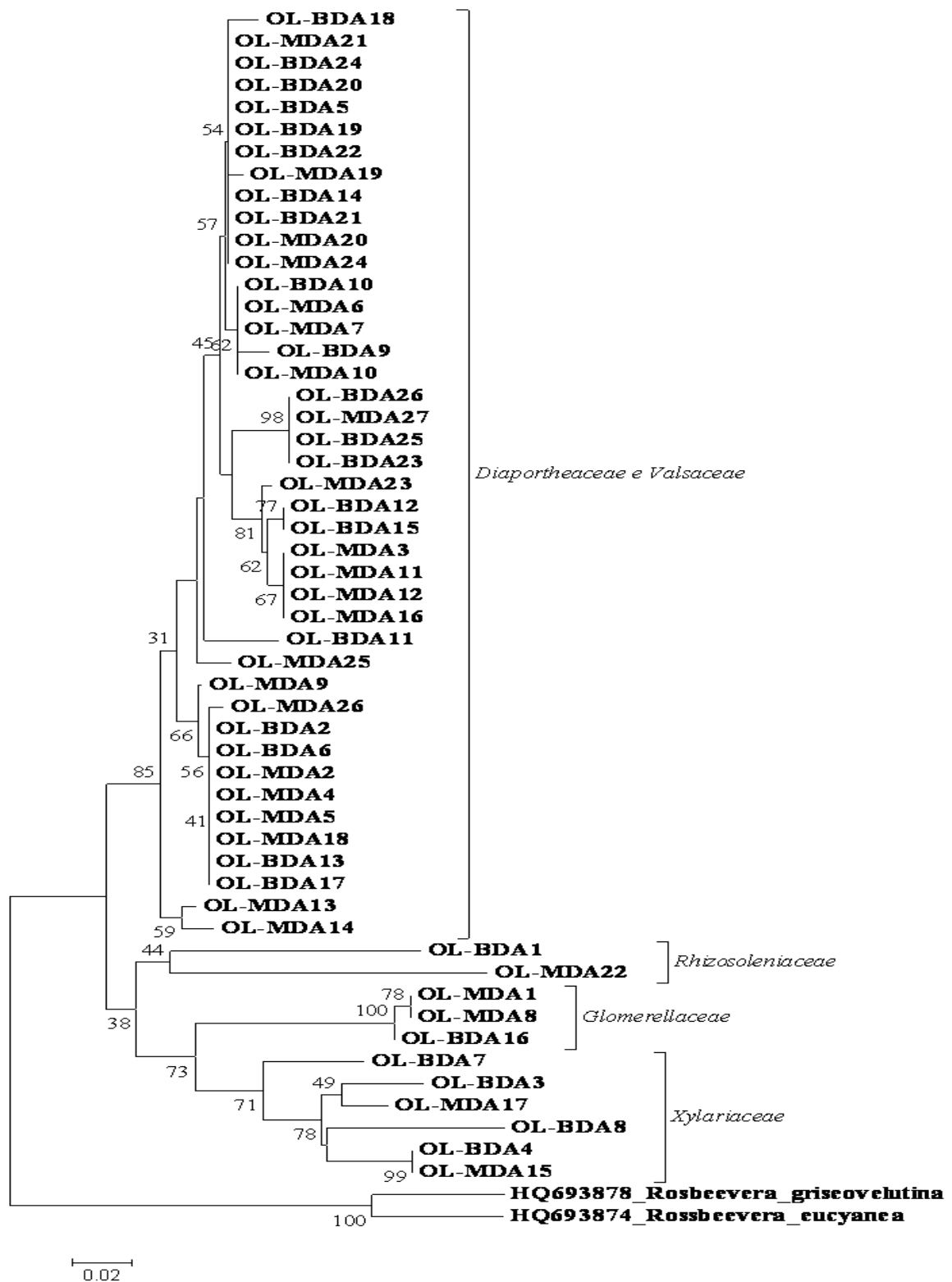


Figura 10 - Análise filogenética formada por seqüências referentes à planta de oliveira. A filogenia foi realizada pelo programa Mega5 baseada na comparação de seqüências de cerca de 500pb do gene 16S rRNA com seqüências disponíveis nos bancos de dados. Os agrupamentos foram calculados com o método muscle, e os dados nos ramos indicam valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações.

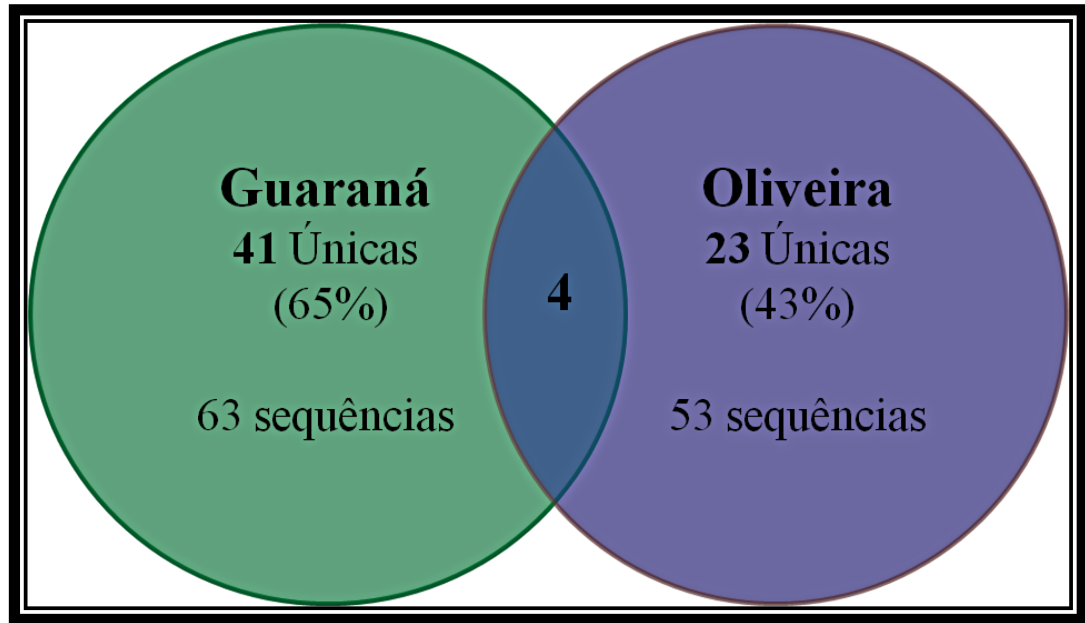


Figura 11 - Diagrama de Venn construído a partir da separação dos grupos taxonômicos operacionais (UTOs).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados dos ensaios realizados no presente trabalho, pode ser concluído que:

- Dentre os cinco meios ensaiados com cinco substratos o MDA foi o que apresentou melhor crescimento micelial em relação a todos os outros meios, podendo ser então utilizado em laboratórios de micologia, com vantagens sobre o tradicional meio BDA quando se quer obter massa micelial abundante. Entretanto, a esporulação dos fungos avaliados foi superior no meio BDA em relação aos outros substratos analisados.
- Foi possível isolar fungos endofíticos a partir do meio MDA das duas espécies de plantas estudadas com frequência superior ao do meio de BDA, especialmente do guaraná, tornando assim o meio MDA de utilidade no isolamento de fungos endofíticos.
- A identificação dos fungos endofíticos revelou que eles variaram conforme a planta hospedeira. A diversidade de fungos endofíticos é maior na planta tropical (guaraná) no meio MDA que em BDA. Já nos mesmos meios a diversidade encontrada no número de espécies de fungos foi praticamente a mesma em oliveira, uma planta de clima temperado.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, K.; NAKATAMI, M.; MOCHIDA, H., Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.48, p.889-895, 2002.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MINS, C.W. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley, p.632, 1979.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v.25, p.3389-3402, 1997.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B(Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2° ed. Piracicaba: Fealq. p.289-381, 1998.
- AOKI, J.; CHIGUSA, K. Studies on the nutrition and metabolism of pathogenic fungi in muscardine disease (1). Nitrogen utilization by synthetic media of *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa* and *I. fumo-rosea*. **Journal of Sericulture**. v.37, p.288-294, 1968.
- AOKI, J.; YANASE, K. Studies on the nutrition and metabolism of pathogenic fungi of muscardine (2). The influences of amino acids for the formation and multiplication of hyphal bodies of *Spicaria fumorosea* (Wize) Vassil. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Journal of Sericulture**. v.39, p.285-292, 1970.
- ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T., MARCON, J., LIMA, A.O.de S., SOBRAL, J.K., PIZZIRANI-KLEINER, A.A., AZEVEDO, J.L.de. Guia prático: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos. Piracicaba: CALO, p. 167, 2010.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.J.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and Interactions Between Endophytic Bacteria and Fungi Isolated From Leaf Tissues of Citrus Rootstocks. **Canadian Journal Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR., W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of Endophytic Bacterial Population and Their Interaction With *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002.

ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, v.3: p.267-274, 2000.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; ARAÚJO, W.L. Importância dos micro-organismos endofíticos na agricultura. **Revisão anual de patologia de plantas**, v.11, p.115-137, 2003.j

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Micro-organismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: AZEVEDO, J.L.; BARROS, N.M.; SERAFINI, L.A. (Ed.) **Biotechnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**, Caxias do Sul - RS, Editora EDUCS, p.233-268, 2002.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.3, p.40-65, 2000.

AZEVEDO, J.N.; DUARTE, R.L.R. **Cultivo do cará**. Teresina (PI), Embrapa/CPAMN. 19 p. (Circular Técnica, 18), 1998.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L..Diversity and Applications of Endophytic Fungi Isolated from Tropical Plants. InB. N.Ganguli & s.t. Deshmukh (Edts). *Fungi multifaceted microbes*; Anamaya Publ. Nex Delhi. p..189-207, 2007.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, H. A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI, W.JR.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *Guignardia mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, p. 464-477, 2002.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; BALDANI, V.L.D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Edts.). **Biotechnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**, Caxias do Sul - RS, Editora EDUCS, c.7, p.195-232, 2002.

BALKAN, B; ERTAN, F. Produção e propriedades de alfa-amilase de *Penicillium chrysogenum* e sua aplicação na hidrólise do amido. **Biochemistre Biotechnology**, v.35, p.169-78, 2005.

BANCERZ, R.G.; GINALSKA, F.; FIEDUREK, J; GROMADA, A. "condições de cultivo e propriedades de lipase extracelular cruda a partir do fungo *Penicillium chrysogenum* psicotróficos" **Jornal Indian Microbiology and Biotechnology**, v.32(6): p.253-260, 2005.

BARÇAÇA, T. Kate C. **Palestra**: Ciclo do Carbono. Winter, 2008.

BLANCHETTE, F.; ROBERT A.; TODD, A.; BURNS, U. **Seleção de Rot-White Fungi para Biopulping**. Departamento de Fitopatologia da Universidade de Minnesota, 1987.

BRUNELLI, K.R.; FAZZA, A.C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L.E.A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zeae-maydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, p. 92-94, 2006.

BURDSALL, H.H. Jr. A contribution to the taxonomy of the genus *Phanerochaete* (Corticaceae, Aphyllophorales). – **Mycology Membership**, p.10. J. Cramer, Braunschweig, 1985.

BURDSALL, H.H. Jr. A new *Phanerochaete* with a *Chrysosporium* imperfect state" in **Mycotaxon**, v.1: p. 124, 1974.

BURGES, L.W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S.; GOTT, K.P. e BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for *Fusarium* research**. Sydney, University of Sydney.1994.

CARLILE, MICHAEL J.; SARAH C.; WATKINSON G.; WATKINSON G. **Os fungos**. Segunda edição. San Diego, Califórnia: Academic Press, 2001.

CARNAUBA, J.P.; SOBRAL, M.F.; AMORIM, E.P. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa phytopathology**, v.33, p.199-200, 2007. ISSN 0100-5405.

CASTRILLO, L.A.; VANDENBERG, J.D.; WRIGHT, S.P. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. **Journal Invertebrate Pathology**, v.82, p.75-83, 2003.

CEREDA, M.P. **Importância, modo de consumo e perspectiva para raízes e tubérculos de hortícolas no Brasil**. In: Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do cará, 1., 2001, Vila Nova do Imigrante. Anais... Vila Nova do Imigrante: Empresa Capixaba de Pesquisa e Extensão, p.27-32, 2001.

CEREDA, M.P. Processamento de mandioca como mecanismo de detoxificação. In: CEREDA, M.P.; VILPOUX, O. (Coord.) **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v.3, p.47-80, 2003. (Série Culturas e Tuberosas Latino-americanas).

COUTINHO, E.F.; CAPPELLARO, T.H.; RIBEIRO, F.C.; HAERTER, J.A. Introdução e Importância Econômica. IN: Coutinho, E.F.; Ribeiro, F.C.; Cappellaro, T.H. (Ed.). **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.125, 2009. — (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 16).

COUTINHO, T.A.; PREISIG, O.; MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M.C.; RIEDEL, K.H.; SWINGS, J.; WINGFIELD, M.J. Bacterial Blight and Dieback of Eucalyptus species, Hybrids, and Clones in South Africa, **Plant Disease**, v.86, p.20-25, 2002.

CRANCIO, L.A. **Oliveira: Características Botânicas**. junho/2002. Disponível em: www.ufrgs.br/alimentus/feira/mpoutro/oliva/cabot.htm. Acesso em: 03 abr. 2012.

DE BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze**, Fleethen, und myxomyceten. Leipzig: Engelamn, p.316, 1866.

DE HOOG, C.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Studies in Mycology**, v.1, p.1-41, 1972.

DIAS, M.C.; XAVIER, J.J. B.N.; BARRETO, J.F. **Aipim Manteiga**: cultivar de macaxeira para o Amazonas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2003. 4p. (Embrapa Amazônia Ocidental, 2003. 4 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Comunicado Técnico, 17).

ELPO, E.R; NEGRELLE, S.E. Caeia produtiva do Gengibre (*Zingiber Officinale* Roscoe) no estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade, **Scientia Agrária**. v.7, p.121-122, 2006.

ESPOSITO, E.; SILVA, M.O Papel dos Fungos na Recuperação Ambiental, p 337-375, 2010. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos Uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. 2ª Ed. revisada e ampliada. Universidade Federal Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Base de Dados**. In: <http://www.fao.org>. Acesso em 3/09/2008.

FARGUES, J.; MANIANIA, N.K.; DELMAS, J.C.; SMITS, N. Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. **Agronomie**, v.12, p.557-564, 1992.

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: Esposito, E. & Azevedo, J. L. (orgs.) **Fungos: uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. pp 15-242. Editora da UCS, Caxias do Sul, 538p, 2010.

FERREIRA, A.B.; MING, L.C.; CHECHETTO, F.; PINTO, R.A. Dioscoreáceas cultivadas por agricultores da baixada cuiabana em Mato Grosso – Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v.6, p.201-208, 2010.

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. In: BURGESS, H.D. (ed.). **Microbiol control of pests and plant diseases**. London, Academic Press, p.465-482, 1978.

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. In: BURGESS, H.D. (ed.). **Microbiol control of pests and plant diseases**. London, Academic Press, p.465-482, 1981.

FIGUEIREDO, L.C.; DE FIGUEIREDO, G.S.; GIANCOLI, A.C.H.; TANAKA, F.A.O.; DA SILVA, L.A.O.; KITAJIMA, E.W.; FILHO, S.A.; AZEVEDO, J.L. Detection of isometric, dsRNA-containing viral particles in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cashew tree. **Tropical Plant Pathology**, v.37, p.142-145, 2012.

FINGER, F.L.; DIAS, D.C.F. dos S.; PUIATTI, M. 2005 Cultura da Cenoura. In: FONTES, P. C. R. (Ed.) Olericultura: Teoria e Prática. Viçosa, Minas Gerais, cap. 24, p. 371-384.

FRAIFE FILHO, G.A.; RAMOS, J.V. **Guaraná**. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/guarana.htm>. Acesso em: 03 abr. 2012.

FUKUDA, W.M.G.; FUKUDA, C.; DIAS, M.C.; XAVIER, J.J.B.N.; FIALHO, J.F. Variedades. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca. **Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, p. 433-454, 2006.

FUXA, J.R.; TANADA, Y. Epidemiological concepts applied to insect pathology. In; FUXA, J.R.; TANADY, Y. ed. **Epizootiology of insect diseases**. New York, p.3-22, 1987.

GIUNTINI, E.B., LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos TBCA-USP (Versões 3 e 4) no contexto internacional. **ALAN**, dic., v.56, p.366-374, 2006.

GOMES, S.Z.; PEÑA, M.C.G. Digestibilidade aparente da mandioca (*Manioc esculenta*) pelo camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, p.858-862, 1997.

GONZAGA, D.S.O.M.; RODRIGUES, V. G. Gengibre – *Zingiber officinale* Roscoe. **Porto Velho, Rondônia: EMBRAPA Folder 12** – Série “Plantas Medicinais”, dez. 2001.

HAJEK, A.E.; EASTBURN. C. Effect of host insects on activation of *Entomophaga maimaiga* resting spores. **Journal Invertebrate Pathology**, v4, p.290, 2001.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro: 2009.

KUCERA, M. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. II- Effect of nitrogen Sources on formation of the toxic protease in submerged culture. **Journal. Invertebrate Pathology**, v.17, p.211-215, 1971.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bactéria from soybean (*Glycine max*) grown on soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and soil**, v.273, p.91-99, 2005.

KUMAR, J.P.; JAMAL, T.; DOETSCH, A.; TURNER, F.R.; DUFFY, J.B. CREB binding protein functions during successive stages of eye development in *Drosophila*. **Genetics** 168: 877-893. 2004.

LACAVA, P.T.; SEBASTIANES, F.L.S. e AZEVEDO, J.L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In “E. ESPOSITO e J. L. AZEVEDO; (Edts). **Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Univ. Caxias do Sul, RS, 2ª Ed. p.533-569, 2010.

LIMA, J.A.S. **Caracterização patogênica, fisiológica, cultural e isoesterástica de isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat., agente causal da morte descendente da mangueira (*Mangifera indica* L.)**. (Dissertação de mestrado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1996.

LINK, H.F. Observations in ordines plantarum naturalis, **Dissetatio I. Mag. Ges. Naturf.** Freunde. Berlin 3: 3-42, 1809.

MAGALHÃES, C.J.V. **O Selvagem**, pp. 134-135 - transcrito por CASCUDO, op. cit, verbete *Mani*, (1876).

MARQUES, J.A.; PRADO, I.N.; ZEOULA, L.M. Avaliação da mandioca e seus resíduos industriais em substituição ao milho no desempenho de novilhas confinadas. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.29, p.1528-1536, 2000.

MARTINEZ, D. *et al.* "Seqüência do genoma do fungo degradante tensão lignocelulose *Phanerochaete chrysosporium* RP78." **Nature Biotechnology**, v.22, p.695-700, 2004.

McCOY, C.W.; SAMSON, R.A.; BOUCIAS, D.G. Entomogenous fungi. In: Ignoffo (Ed.), Handbook of Natural pesticides. **Microbial Insecticides Part A**.CRC Press, Florida, 1988.

McLEOD, D.M. Ivestigations on the genera *Beauveria* Vuill. And *Tritirachium limber*. **Canadian Journal of Botany**, v.32, p.818-893, 1954.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico II**. Editora EMBRAPA, Jaguariúna, 262p, 2000.

MONTALO, A. **Cultivo de Raices Y Tubércuos e tropicales**. II CA; San Jose, p.408, 1991.

MOURA, R.M.; OLIVEIRA, I.S.; TORRES, G.R.C. Primeiro Assinalamento de *Scutellonema bradys* em *Dioscorea alata* no Brasil, Estabelecido no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, 2006.

MURRAY, F.R.; LATTCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perene*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular and Genetics**, v.233, p.1-9, 1992.

NAKASONE, K. Cultural studies and identification of wood-inhabiting Corticiaceae and selected Hymenomycetes from North America. **Memoir Mycologia**, v.15, p.224-225, 1990.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. e MARASAS, W.F.O. ***Fusarium* species an illustrated manual for indentification**. University Park: The Pennsylvania State University Press. 1983.

NOZAKI, M.H., CAMARGO, M. e BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira** 29:429-432. 2004.

OLIVEIRA, A.F. **Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões in vitro de oliveira (*Olea europaea* L.)**. 2001. 122 p. (Tese - Doutorado em Agronomia) – Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001.

PEDIGO, L.P.; STONE, J.D.; LENTZ, G.L. Biological synopsis of the green cloverworm in central Iowa. **Journal of Economic Entomology**, v.66, p.665-673, 1953.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; Micro-organismos Endofíticos-Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.63-76, 2002.

PEREIRA, A.S. Composição Química, Valor Nutricional e Industrialização. In: REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Coord.) **Produção de Batata**. Brasília: Linha Gráfica pp.12-28, 1987.

PEREIRA, A.S. Batata: Fonte de alimentos para a humanidade. **Horticultura Brasileira**. Brasília: n.1, v.26, p. contra-cap, 2008.

PÉREZ, A.E. Raíces y tubérculos. IN: LEÓN, Alberto Edel...[et.al.], **De Tales Harinas, Tales Panes**: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica, - Córdoba : Hugo Báez Editor, 1º ed., p.363-402, 2006.

PERONI, N.; MARTINS, P.S. ANDO, A. Diversidade inter e intra-específica e uso de análise multivariada para morfologia da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): um estudo de caso. Piracicaba: **Scientia Agrícola**, vol.56. n.3, 1999.

PEROZZI, M. **Instituto Maniva quer fortalecer educação e cultura da mandioca.** 2008. Disponível em: <http://www.mandioca.agr.br/portal/index.php?option=content&task=view&id=3782&Itemid=59>. Acessado em: 25/06/2008.

PIMENTEL, I.C. **Fungos endofíticos de milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine max* L. Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas.** Tese (doutorado) Curitiba 154p. Universidade Federal do Paraná, 2001.

POLO, S.H.O. **Estrutura e Desenvolvimento de Sementes de *Paullinia* L. (Sapindaceae).** Dissertação (Mestrado em Biologia vegetal). Campinas: Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia, 1178f. 2006.

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

RAO, C.U.M.; DEVI, K.U.; KHAN, P.A.A. Effect of combination treatment with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi* (Hypocreales) on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science. and Technology** v.16, p.221-232, 2006.

RIBEIRO FILHO, N.M.; FLORÊNCIO, I.M.; BRITO, A.C.; DANTAS, J.P.; CAVALCANTI, M.T. Avaliação nutricional de raízes de faveleira e cenoura em períodos equidistantes de coleta. Campina Grande: **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, , v.13, p.169-175, 2011.

RIKER, A.G.; RIKER, R.S. **Introduction to research on plant disease.** John S. Swit Co., St. Louis, 117p. 193, 1936.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D.W. (2001), **Molecular Cloning: A laboratory Manual.** 3ªed. New York: Cold Spring Harbor. 2009

SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v.50, p.1-8, 2005.

SCHAERFFENBERG, G. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.6, p.8-20, 1964.

SCHLOSS, P.D. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl. Environ. Microbial**, v.75, p.7537–7541, 2009.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.; VAN DIJCK, P. "Sobre a segurança do *Aspergillus niger* - uma revisão". **Microbiologia Aplicada e Biotecnologia**, v.59. p. 426-435, 2002.

SEBADELHE, C.S.M. **Contribuição do Sector do Azeite para a Produção de Biodiesel**. 2008, 137f. (Dissertação - Mestrado em olivicultura, azeite e azeitona de mesa). Lisboa. UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA - INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA. 2008.

SEAGRI: Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária - SIAGRI (2012). Cultura do Cará. 2012.

SILVA, J.R. Mandioca e outras raízes tropicais: uma base alimentar da humanidade no século XXI. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE RAÍZES TROPICAIS, 1.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA 9., 1996, São Pedro, SP. **Programa e resumos**. São Pedro: SBM, p. 12-16, 1996.

SMITH, R.J.; GRULA, E.A. Nutritional requeriments for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.37, p.222-230, 1981.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005, 177f. (Dissertação-Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxonomyces andreane* an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v.260, p.214-216, 1993.

SUKLA, Y. Câncer preventive properties of ginger. A brief review Food and Chemical Toxcicology, **Science Direct Elsevier Ltd.** v.45, p.683-690, 2007.

SURYANARAYANAN, T.S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T.S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**, 85: 489-493, 2003.

TOSHIKI, U.; FUMIAKI N.; TAKAYOSHI H. "Degradação da lignina chrysosporium by Phanerochaete: Metabolismo de um composto fenólico modelo phenylcoumaran subestrutura. **Archives of Microbiology**, 131, 1982.

TOURNAS V.H. A deterioração de hortaliças por bactérias e fungos e riscos relacionados à saúde". **Critical Reviews in Microbiology**, v.31 (1): 33-44, 2005.

TOZZI, P. **Propriedades nutricionais do Gengibre** 16/12/2011. São Roque: Jornal da Economia [on-line]. Disponível em: www.jeonline.com.br/editorias/colunas/paulatozzi. Acesso em: 30 mar. 2012

TRIPLETT, E.W.; DONG, Y.; INIGUEZ, A.L.; AHMER, B.M.M.; Kinetics and Strain Specificity of Rhizosphere and Endophytic Colonization by Enteric Bacteria on Seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1783-1790, 2003.

Van den VONDERVOORT, P.; POULSEN, B.; RUIJTER, G.; SCHULEIT, T.; VISSER, J.; IVERSEN, J. Isolation "de um mutante fluffy de *Aspergillus niger* da cultura quemostato e seu uso potencial como um *host* morfológicas estáveis para a produção de proteínas. **Biotecnologia e Bioengenharia**, v.86. p.301-307, 2004.

VIEIRA, J.V.; MAKISHIMA, N. (Ed). **Cultura da Cenoura**. Brasília: Embrapa Hortaliças, (Sistema de produção 02). 2000. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cenoura/index.htm>. Acesso em: 20 mar. 2012.

VILELA N.J.; BORGES I.O. **Retrospectiva e situação atual da cenoura no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 9p. (Circular Técnica, 59), 2008.

VIOLA, S.; ARIELI, Y.; ZOHAR, G. Unusual feedstuffs (tapioca and lupin) as ingredients for carp and tilapia feeds in intensive culture. **Israel Journal Aquaculture**, v.40, p.29-34, 1988.

VOLK, W. A; WHEELER, M.F. **Basic Microbiology**, Harper & Row, Publ; New York, 687p, 1988.

VUILLEMIN, P. Beauveria, nouveau genre de Verticilliacées. **Bulletin de la Société botanique de France**, v.29: 34-40, 1912.

WHITTAKER, R.H.C. New concepts of Kingdoms of organisms. **Science**, v.163, p.150-160, 1969.

WOLLENWEBER, H.; REINKING, O.A. Die *Fusarien*, p.1-355, fig.1-95. **Paul Parey**. Berlin, 1935.