

BIOCONTROLE *in vitro* DE *Didymella bryoniae* POR FUNGOS ENDOFITICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE *Piper amalago* L.

IN VITRO BIOCONTROL OF *Didymella bryoniae* BY ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Piper amalago* L. LEAVES

SANDRA CRISTINA ZOTTI¹, BRUNA THAIS FLECK², PABLO LUAN ELI³, JULIANA BERNARDI-WENZEL^{4*}

1. Bióloga graduada no Curso de Ciências Biológicas– Universidade Paranaense – UNIPAR – Unidade de Toledo; 2. Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas– Universidade Paranaense – UNIPAR – Unidade de Toledo; 3. Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas– Universidade Paranaense – UNIPAR – Unidade de Toledo; 4. Bióloga, Doutora pela Universidade Estadual de Maringá, docente do Curso de Ciências Biológicas– Universidade Paranaense – UNIPAR – Unidade de Toledo.

* Av. Parigot de Souza, 3636, Jardim Prada, Toledo, Paraná, Brasil. CEP: 85903-170. julianab@unipar.br

Recebido em 29/05/2015. Aceito para publicação em 11/06/2015

RESUMO

Microrganismos endofíticos habitam principalmente as partes aéreas das plantas, como folhas e caules, em geral são constituídos por fungos e bactérias, que vivem em uma relação mutualística, proporcionando proteção às plantas contra fitopatógenos, herbivoria e insetos. Uma das doenças que mais afeta a cultura da melancia (*Citrullus lanatus*) e provoca grandes prejuízos à agricultura, é o crestamento gomoso, causado pelo fungo *Didymella bryoniae*, que em condições ideais de desenvolvimento, afeta todas as fases da planta, provocando o tombamento de plântulas, lesões circulares nas folhas e formação de cancos no caule, nas hastes e nos frutos, com exsudação de goma. Fungos endofíticos podem apresentar propriedades antagônicas a fitopatógenos, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de controle *in vitro* de fungos endofíticos isolados de *Piper amalago* ao crescimento de *D. bryoniae*. Foram avaliados 26 isolados de *P. amalago*, por meio da metodologia da cultura pareada, na qual os endofíticos e o fitopatógeno foram inoculados em lados opostos das placas de Petri, sendo incubados à uma temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por sete dias. Dos 26 fungos endofíticos isolados de *P. amalago* testados, cinco demonstraram efeito antagônico contra o *D. bryoniae*, inibindo totalmente seu crescimento, demonstrando seu potencial para o controle biológico deste patógeno.

PALAVRAS-CHAVE: Crestamento gomoso, antagonismo, controle biológico, melancia, *Citrullus lanatus*.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms live mainly in the aerial parts of the plants, as leaves and stalks; are generally constituted of fungi and bacteria, which live in a mutualistic relationship,

providing protection to the plants against phytopathogens, herbivory. One of the diseases that affects the watermelon culture (*Citrullus lanatus*) the most and that brings about great losses to agriculture, is the gummy stem blight (GSB), caused by the fungus *Didymella bryoniae*, that in ideal conditions of growth, affects all the phases of the plant, causing the fall of plantules, circular lesions in the leaves and formation of cankers on the stalk, stems and the fruits, with gummy exudation. For the control of this phytopathogen, high levels of agrototoxin are applied, causing great damage to the environment, to human health, and also economic losses to the agriculturists. Thus, it is necessary to evaluate the antagonistic properties of the isolated endophytic fungi of *Piper amalago* confronting the phytopathogen *Didymella bryoniae*. Twenty-six isolated of *P. Amalago* were evaluated, through the paired culture methodology, in triplicate, confronting the phytopathogen, in BDA growth means, inoculated on opposing sides of Petri dishes, being incubated to a temperature of $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ for seven days. Where 5 endophytic fungi showed antagonistic effect against the phytopathogen.

KEYWORDS: Endophytic microorganisms, gummy stem blight, watermelon.

1. INTRODUÇÃO

Encontrados no interior dos vegetais, hospedando órgãos e tecidos, principalmente das partes aéreas como ramos ou caule e folhas, os microrganismos endofíticos podem ser tanto fungos, bactérias ou vírus, que penetram nas plantas por meio de raízes, ferimentos provocados por insetos, por entradas naturais como estômatos e hidatódios, se difundindo em diversas partes das plantas, passando a viver em uma relação mutualística com seus hospedeiros, oferecendo prote-

ção ao vegetal contra patógenos, herbivoria além de outras funções de grande importância para o metabolismo do hospedeiro¹.

Os microrganismos endofíticos foram citados pela primeira vez no início do século XIX, sendo de Bary, em 1866, quem observou uma diferença entre endofíticos e patógenos de plantas². Estes microrganismos passaram despercebidos por décadas, já que não havia conhecimento algum sobre suas verdadeiras funções nas plantas, e muito menos se conhecia sobre a produção de toxinas, produtos farmacológicos e outros produtos promissores para o uso na agricultura como biocontroladores entre outros benefícios que eles podem proporcionar¹.

Passando a conhecer suas funções e a produção de metabólitos secundários, os endofíticos passaram a ser objeto de estudos de muitas pesquisas, visando a busca de novos produtos, como pode ser observado nos doze anos de estudos de SCHULZ et al. (2002)³, que conseguiram isolar mais de 6.500 fungos endofíticos de plantas, com potencial antimicrobiano e anti-herbicida³.

Entre algumas das espécies de vegetais pesquisadas quanto a presença e atividade de fungos endofíticos está a família Piperaceae, que compreende plantas que podem variar de tamanho, desde arbustos até pequenas árvores, aromáticas ou com células oleosas⁵. Com predominância tropical e subtropical, a família Piperaceae, inclui cerca de cinco a oito gêneros, com mais de 2500 espécies, muito comuns nas formações florestais brasileiras, principalmente na Mata Atlântica⁶.

As Piperaceae são plantas de grande importância para a farmacologia, em especial o gênero *Piper*, ao qual pertence a espécie *Piper amalago* L., popularmente conhecida como Pariparoba, poissão plantas usadas na medicina popular, por exemplo como analgésico, antitérmico, para diarreia, dores intensas no estômago, dores de cabeça, distúrbios renais, estomacais, dores musculares, para aliviar a coceira após picadas de insetos, queimaduras, sendo utilizada desde as folhas até as raízes, tanto em infusão, ou como no caso das folhas, maceradas ou decocção, já na aplicação farmacológica o gênero possui atividade antimicrobiana, pode ser usado para extração de óleos, entre outros compostos de grande importância⁵.

Juntamente com o desenvolvimento da humanidade desenvolveram-se muitas doenças, sobretudo de plantas, reduzindo a produção de alimentos necessários para a sobrevivência, induzindo ao uso de produtos altamente prejudiciais para o controle das doenças, como os fungicidas e inseticidas, porém, a partir do crescente desenvolvimento biotecnológico, desenvolveram-se alternativas menos agressivas ao ambiente, como substâncias indutoras de resistência, organismos

antagônicos, profilaxia, plantas resistentes, obtidas por meios convencionais ou pela melhoria da engenharia genética, além de manejos culturais, como a rotação de culturas⁷.

A melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsumura & Nakai) que pertence à família das Cucurbitáceas possui centro de origem africano, cultura cosmopolita, introduzida no Brasil pelos escravos, podendo ser cultivada sob irrigação ou sequeiro, diferentemente do cultivo irrigado, o cultivo no sequeiro tem ocorrência o ano todo, o sequeiro utiliza os tipos locais apenas uma vez por ano, em períodos chuvosos, apresentando variabilidade tanto nas características externas, quanto nas internas, como cor da polpa, conservação pós colheita, teor de açúcar, entre outros sendo cultivada em vários locais do Brasil, com maior concentração nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sul⁹.

Segundo dados do IBGE (2010)¹⁰, a produção nacional no ano de 2010 foi de 2.052,928 toneladas, em uma área de 96.477 hectares¹⁰. Seu uso é predominantemente in natura, na forma de sucos, geleias, doces, molhos, em saladas, tanto o uso pode ser da polpa, como também da casca e sementes, tendo um papel importante na alimentação humana, pois a melancia contém antioxidantes, sais minerais, vitaminas como A, B e C, eliminação de resíduos do aparelho digestivo, funciona como laxante, diurético, além de baixo valor calórico, muito recomendada para uso em dietas⁹.

Mesmo estando entre os maiores produtores mundiais de melancia, o Brasil tem uma produtividade relativamente baixa, devido a ocorrência de doenças que limitam a produção e a qualidade dos frutos, entre as doenças de maior importância que ocorre na melancia é causada pelo fungo *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rhen, que provoca o crestamento gomoso do caule, também conhecida como cancro das hastes, podridão gomosa, podridão negra, presente em todas as regiões de clima tropical, produtoras de cucurbitáceas, que sem um controle eficiente, as perdas são muito grandes⁹. Essa doença pode acometer as partes aéreas da planta, em todas as fases do seu desenvolvimento¹². Na fase de plântula, a doença é caracterizada por lesões em forma de círculos nos cotilédones, levando ao tombamento e morte, quando adultas, as folhas também apresentam manchas circulares que podem variar de milímetros a centímetros, os ramos afetados apresentam-se encharcados, com exsudação de goma, coloração parda, com presença de numerosos corpos de frutificação negros, na maioria dos casos os ramos, acima da lesão, acabam secando, quando a infecção ocorre no colo, induz a plantas a morte, nos frutos, os sintomas iniciam-se com pequenas manchas marrons, com exsudação de goma, e com o tempo, as lesões se aprofundam no fruto provocando o apodre-

cimento parcial ou total do mesmo, as formas de transmissão ocorrem por meio de restos culturais de uma safra para outra, ou mesmo pelo solo, sementes infectadas retiradas dos frutos doentes, umidade relativa do ar alta e temperaturas em torno dos 20°C a 28°C, são algumas das condições ideais para o desenvolvimento do fungo¹³.

O fungo possui grande resistência ao sol, chuvas fortes, ventos, permanecendo com capacidade de desenvolvimento no solo e nos restos de plantas por um longo período de tempo, que pode variar de um a três anos, ele também pode ser encontrado nas sementes dos frutos doentes, outro meio de dispersão e de sobrevivência do fungo¹².

As primeiras descrições do fungo, que é um parasita necrotrófico facultativo, das plantas da família das cucurbitáceas¹⁴, foram citadas na França em 1891, em sua fase anamórfica, com o nome de *Ascochyta cucumis* Fautr & Roum, e mais tarde na fase teleomórfica como *Didymellamelonis* Pass^{15,16}, atualmente, a fase teleomórfica recebe a denominação *D. bryoniae*¹¹.

A principal medida de controle a *D. bryoniae* baseia-se na aplicação de fungicidas, o que tem aumentado os custos de produção de melancia, devido aos altos índices de aplicação de fungicidas, e também, o uso indiscriminado desses produtos contribuem para a contaminação de mananciais hídricos e solo, além do patógeno apresentar resistência à alguns componentes dos produtos químicos aplicados¹⁷.

Uma vez que o controle químico tem baixa eficiência no controle do fitopatógeno, há necessidade de se buscar alternativas que não venham a provocar prejuízos econômicos aos agricultores, já que o custo dos agrotóxicos é bastante alto, e que se faz necessário aplicar várias vezes durante as todas as fases de desenvolvimento da planta. Como uma possível alternativa sustentável de controle de patógenos como *D. bryoniae* está o uso de microrganismos endofíticos com potencial antagonico.

Levando em conta os altos custos financeiros e as consequências desastrosas para o meio ambiente e à saúde humana, o uso de produtos químicos para controle de diversos tipos de pragas vem sendo substituído pelo uso de controladores biológicos, todavia, ainda existem dificuldades, como exemplo a disponibilidade no mercado desses produtos e a baixa taxa de eficiência dos que já estão disponíveis⁸. O biocontrole pode ser realizado por meio da utilização de microrganismos de maneira natural, ou por indução de um agente biocontrolador, e vem sendo realizado no Brasil com algumas espécies como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 e com vírus *Baculovirus*, para o controle das cigarrinhas da cana e de pastagens e no controle da *Anticarsia gematalis* na soja, respectivamente e na

cultura de cacau, o fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura de bruxa, é controlado por fungos do gênero *Trichoderma*¹.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de controle de fungos endofíticos isolados de *Piper amalago* contra o crescimento do fitopatógeno *D. bryoniae*, já que estes vivem em um nicho semelhante ao dos patógenos, podendo competir com os mesmos, limitando ou impedindo sua ação sobre a planta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos endofíticos avaliados neste trabalho foram isolados de folhas de *Piper amalago* no ano de 2013 na Universidade Paranaense Unidade de Toledo e encontram-se armazenados no laboratório de Biotecnologia. O fitopatógeno *Didymella bryoniae* foi gentilmente doado pelo Prof. João Lúcio de Azevedo (ESALQ – USP). Os fungos endofíticos foram enumerados de acordo com o ponto de coleta e a sequência de isolamento. Os pontos de coleta foram dois, sendo P1 e P2, de acordo com o nome da planta e conforme a sequência de isolamento os endofíticos foram enumerados como: Pa1, Pa2, Pa3, consecutivamente, para cada um dos pontos de coleta (P1Pa1, P1Pa2...).

Para avaliação do potencial antagonico, foram utilizados 26 fungos endofíticos isolados de *P. amalago* contra o fitopatógeno *D. bryoniae*. A metodologia empregada foi a cultura pareada descrita por Campanile *et al.* (2007)¹⁸, com modificações. Os fungos endofíticos foram rejuvenescidos em meio BDAe incubados por sete dias a 27°C±2°C. Após esse período de incubação, foram extraídos fragmentos de 10mm² de cada um dos fungos endofíticos e do fitopatógeno, em sequência, inoculados nas placas de Petri, em lados opostos, a uma distância de 4 cm entre os fungos, sendo incubados novamente por sete dias a 27°C. Os testes foram realizados em triplicata. Para controle negativo, foi inserido um fragmento, do mesmo tamanho e na mesma posição do teste, contendo apenas o fitopatógeno.

Para análise das interações entre o patógeno e os endofíticos, foi adotada a escala de Badalayan (2002)¹⁹, seguindo os três tipos de interações possíveis, que são: A, B e C, sendo C dividida em quatro subcategorias: CA1, CA2, CB1 e CB2. Sendo: A = “deadlock” com contato micelial; B = “deadlock” a distância ou liberação do substrato no meio; C = crescimento do endofítico sobre o fitopatógeno sem “deadlock” inicial; CA1 e CA2 = crescimento parcial e completo do endofítico sobre o fitopatógeno depois de “deadlock” inicial com contato micelial; CB1 e CB2 = crescimento parcial e completo do endofítico sobre o fito-

patógeno depois de “deadlock” à distância.

Para cada tipo de interação foi atribuída uma pontuação específica: A=1,0; B=2,0; C=3,0; CA1=3,5; CB1=4,0; CA2=4,5 e CB2=5,0.

O índice de antagonismo foi calculado para a interação entre cada isolado x *D. bryoniae* usando a fórmula:

$$IA = N \times I$$

Onde:

N = número de cada tipo de interação e

I = pontuação correspondente.

Para a observação das interações em nível microscópico entre os endofíticos e o fitopatógeno foram colocadas lamínulas sobre o meio de cultura entre os dois fungos, para visualização do aspecto das hifas no microscópio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da metodologia da cultura pareada, pôde-se observar as interações entre os endofíticos e patógeno *D. bryoniae*, nas quais, dos 26 endofíticos isolados testados, cinco conseguiram controlar o crescimento do fitopatógeno. A interação observada entre os endofíticos e o fitopatógeno foi do tipo CB1, em que ocorreu o crescimento completo do endofítico sobre o fitopatógeno, depois de deadlock a distância, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Índice de Antagonismo (IA) e os tipos ou subtipos de interações entre fungos endofíticos isolados de *Piper amalago* e o fitopatógeno *Didymella bryoniae*, usando a pontuação da escala de Badalyan.

Fungos isolados	IA	Tipos de interações
P1Pa1	12	CB1*
P1Pa10	12	CB1
P1Pa11	12	CB1
P2Pa3	12	CB1
P2Pa6	12	CB1

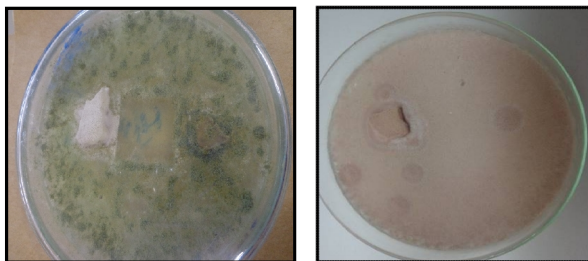


Figura 1. Interação apresentada entre os fungos endofíticos e o fitopatógeno. A: interação do tipo CB1: crescimento completo do endofítico sobre o patógeno após “deadlock” à distância. B: controle do fitopatógeno *Didymella bryoniae*. CB1 = crescimento

completo do endofítico sobre o fitopatógeno depois de “deadlock” inicial a distância.

Para observação em nível microscópico das interações foram colocadas lamínulas entre os fungos endofíticos e o fitopatógeno, mas não houve crescimento dos fungos sobre a lamínula, não possibilitando assim a visualização das interações microscópicas.

4. DISCUSSÃO

Os resultados mostrados no presente trabalho corroboram com os encontrados por Campanile et al. (2007)¹⁸, que observaram interações entre os fungos endofíticos isolados de *Quercus cerris* e *Q. pubescens* e *Diplodia corticola*, agente causal do cancro e morte de espécies de carvalho. De maneira semelhante, Bernardi-Wenzel et al. (2012)²⁰ verificaram a atividade antagonística de fungos endofíticos isolados de soja contra os patógenos *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis* sp., *Fusarium solani* f. sp. *glycines*.

Em estudos semelhantes Souza et al. (2004)²¹ isolaram um total de 645 endófitos entre bactérias e fungos e puderam observar nos primeiros isolados bacterianos uma resistência ao antibiótico terramicina e o potencial de inibição do crescimento dos fungos *Guignardia* e *Colletotrichum*. Já Chapla et al. (2012)⁴, no desenvolvimento de suas pesquisas, estudaram fungos endofíticos isolados de oito espécies de plantas: *Alibertia macrophylla* K.Schum., *Casearia sylvestris* Swatz, *Ocotea corymbosa* (Meisn.) Mez, *Senna spectabilis* (DC.) H.S. Irwin & Barneby, *Piper aduncum* Vell., *Cryptocaria mandioccana* Meisn., *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. e *Palicourea marcgravi* A.St.-Hil., onde obtiveram 42 produtos naturais, que foram submetidos à avaliação das atividades antifúngica, antioxidante, anticolinesterásica e anticancerígena, estas substâncias encontradas apresentaram algum tipo de atividade biológica, inclusive contra os fungos fitopatogênicos como *Cladosporium sphaerospermum* e *C. Cladosporoides*.

Assim como Almeida et al. (2005)²² isolaram endófitos de ápices de pupunheiras com potencial inibitório dos patógenos causadores do apodrecimento radicular de pupunheiras, sendo os isolados identificados como *Epicoccum nigrum* e *Neotyphodium*, podendo ser verificado o grande potencial destes microrganismos, e sua aplicação na medicina, agricultura ou indústria, assemelhando-se aos resultados do presente estudo na avaliação de fungos para biocontrole e que ainda terão suas propriedades químicas descritas.

Em outros trabalhos também foi possível verificar que nem todos os fungos endofíticos possuem capacidade para biocontrole, esta condição é dependente de vários fatores da interação entre microrganismos, bem como as características próprias de cada espécie Cor-

rêa (2008)²³.

Silva *et al.* (2008)⁸ isolaram o fungo patogênico *Phytophthora citrophthora* de plantas infectadas de Limão cravo, de um pomar comercial, onde observaram que os isolados de *Trichoderma stromaticum*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma virens* apresentaram maior antagonismo ao patógeno estudado, sendo que o isolado *T. stromaticum* foi o que apresentou maior inibição, ocupando mais de 52% da placa. Já o isolado *T. harzianum* apresentou o menor índice antagonístico de pouco mais de 15% e Rubini *et al.* (2005)²⁴ estudaram uma comunidade de fungos endofíticos de cacauzeiros resistentes e suscetíveis à doença vassoura-de-bruxa provocada pelo fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*. Neste estudo foram identificados e avaliados *in vitro* e *in vivo* isolados com potencial de inibir o fitopatógeno, entre os avaliados o fungo *Gliocadium catenulatum* reduziu a ocorrência da doença do cacauzeiro em 70%, indicando que os endófitos testados no presente trabalho que apresentaram potencial para o biocontrole de *D. bryoniae* apresentaram atividade antagonística elevada, já que apresentaram crescimento superior a 90% da área da placa.

Em estudos de antibiose *in vitro* Silva *et al.* (2013)²⁵ testaram actinomicetos isolados da rizosfera de plantas do cerrado baiano contra o fungo entomopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, tendo como resultado do trabalho efeito antagonístico significativo sobre o patógeno., do mesmo modo como no atual estudo, obteve-se resultado considerável.

Silva *et al.* (2008)²⁶ usaram 52 bactérias endofíticas isoladas de tomateiros e pimentões, para o controle da pinta bacteriana do tomateiro, que provoca grandes perdas na cultura, desses 53 isolados 9 apresentaram eficiência no controle do fitopatógeno do tomateiro, assim como no presente trabalho índice de endófitos promissores no biocontrole do fitopatógeno estudado é baixo por ser um patógeno de difícil controle.

Rocha *et al.* (2009)²⁷ testaram em cultura pareada 12 linhagens de fungos endofíticos isolados de folhas de confeiteiro frente a linhagem fitopatogênica *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 1884, agente causal do mofo branco de culturas de feijão, desses 12 isolados 4 apresentaram zonas de inibição, sendo um indicativo de antibiose com um valor de 46,7% a 50,0% de redução de crescimento micelial do fitopatógeno. Quanto que, nesse trabalho observou-se, na avaliação *in vitro*, 90% de redução no crescimento do fitopatógeno estudado.

Os resultados verificados neste trabalho intensificam a importância de estudos sobre uma gama de fungos endofíticos, já que os fitopatógenos provocam grandes danos à várias culturas e que muitos deles são de difícil controle, pois em algumas ocasiões pouco se conhece sobre eles, tornando assim mais difícil seu

controle. Assim como pode ser verificado no trabalho de Louzada *et al.* (2009)²⁸, onde fizeram coleta de amostras de solo de seis estados diferentes com o objetivo de selecionar isolados com potencial controlador de doenças, foram conduziram testes em cultura pareada em BDA contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 1884, *Fusarium solani* f.sp. *phaesoli*. Dos 230 isolados obtidos identificaram ser pertencentes ao gênero *Trichoderma*, destes 50 isolados inibiram o crescimento micelial de *F. solani* e 111 inibiram *S. sclerotiorum*. Aproximadamente metade dos isolados de *Trichoderma* não foram efetivos contra *F. solani* (Mart.) Appel & Wollenw. 1910, enquanto para *S. sclerotiorum* esse índice foi de apenas 14%.

5. CONCLUSÃO

O fitopatógeno *D. bryoniae* demonstrou ser um patógeno de difícil controle, principalmente por apresentar crescimento rápido, tendo sido controlado por apenas cinco dos 26 fungos endofíticos isolados de *Piper amalago*, o que demonstra a necessidade de mais estudos visando o biocontrole deste fitopatógeno.

REFERÊNCIAS

- [1] Peixoto Neto PAS, Azevedo JL, Araújo WL. Micro-organismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 2002; 29:62-76.
- [2] Azevedo JL. Micro-organismos endofíticos. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás UFGO, Campus Samambaia 1998; 117-137.
- [3] Schulz B, Boyle C. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Cambridge University Press 2002; 106(9): 996-1004.
- [4] Chapla VM, Biasetto CR., Araújo AR. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. Revista Virtual Química 2012; 5(3): 421-437.
- [5] Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA, Mariot A, Portilho WG, Reis MS. Piperales medicinais. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª ed. São Paulo: UNESP; 2002.
- [6] Lemes SAL, Silva MR, Vieira AMC, Silva CPA, Batista JS, Andrade MLF, Carniello MA. Espécies da família Piperaceae ocorrentes na Estação Ecológica Serra das Araras, Mato Grosso, Brasil. In: 64º Congresso Nacional de Botânica Belo Horizonte; 2013; nov 10-15; Belo Horizonte. Minas Gerais; 2013.
- [7] Costa AZM. A fitopatologia, o meio ambiente e a sustentabilidade. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia Bahia; 2006; Bahia; 2006.
- [8] Silva KS, Rebouças TNH, Bonfim MP, Silva DS, São José AR, Benett CGS. Atividade antagonística *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. Semina: Ciências Agrárias 2008; 29(4): 749-754.

- [9] Souza Dias RC, Rezende GM. Sistema de produção de melancia. Embrapa 2010. [acesso 10 jun. 2014] Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes-HT-ML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>
- [10] Instituto Brasileiro de Geografia Estatística: IBGE 2010. [acesso 10 jun. 2014] Disponível em : http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf:
- [11] Santos GR, Leão EU, Castro HG, Nascimento IR, Sarmiento RA, Brum RBCS. Crestamento gomoso do caule da melancia: Etiologia, epidemiologia e medidas de controle. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 2011 May; 2(2): 52-58.
- [12] Cardoso MO, Boher B, Ávila AC, Assis LAG. Doenças das cucurbitáceas do Estado do Amazonas. Circular Técnica 2001. [acesso 5 jun. 2014] Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAA-2009-09/7055/1/circ_tec9.pdf
- [13] Ferrari GN, Suguino E, Martins AN, Compagnol R, Furlaneto FPB, Minami K. A cultura da melancia, p. 35. Universidade de São Paulo USP, 2013. [acesso 25 jun. 2014] Disponível em: [www.esaERRARI, G. N. Et al. A cultura da melancia, p. 35. Universidade de São Paulo USP, 2013.lq.usp.br/biblioteca/PUBLICACAO/SP54/Melancia.pdf](http://www.esaERRARI.G.N.Et.al.A.cultura.da.melancia.p.35.Universidade.de.São.Paulo.USP,2013.lq.usp.br/biblioteca/PUBLICACAO/SP54/Melancia.pdf)
- [14] Svedelius G. Effects of environmental factors and leaf age on growth and infectivity of *Didymella bryoniae*. *Mycological Research* 2002; 97: 885-889.
- [15] Wiant, JS. *Mycosphaerella* black rot of cucurbits. *Journal of agricultural Research* 1945; 71, 193-213.
- [16] Chiu WF, Walker JC. Physiology and pathogenicity of the cucurbit blackrot fungus. *Journal of Agricultural Research* 1949; 78: 589-615.
- [17] Santos GR, Leão Eu, Garcia MMV, Maluf WR, Cardon CH, Gonçalves CG, Nascimento IR. Manejo e adubação potássica e da irrigação no progresso de doenças fúngicas e produtividade da melancia. *Horticultura Brasileira* 2013; 31(4): 540-548.
- [18] Campanile G, Ruscelli A, Luisi N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in plant tests. *Eur J, Plant Pathol* 2007; 117: 237-246.
- [19] Badalyan SM, Innocenti G, Garibyan NG. Antagonistic activity of xylotropic mushrooms against pathogenic fungi of cereal in dual culture. *Phytopathologia Mediterranea* 2002; 41(3): 200-225.
- [20] Bernardi-Wenzel J, Siqueira AL, Burini FAG, Hein DPR, Silveira JA, Romani S. Isolamento e atividade-antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) 2012; 7(3): 86-96.
- [21] Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. *ACTA Amazônica* 2004; 34(2): 185-195.
- [22] Almeida CV, Yara R, Almeida M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. *Pesquisa agropecuária brasileira* 2005; 40(5): 467-470.
- [23] Corrêa AS. Avaliação da microbiota endofítica de citros com potencial antagonico no controle biológico de *Guignardia citricarpa*. [tese] Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- [24] Rubini MR. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of wicche's broom disease. *International Journal of Biological Sciences* 2005.
- [25] Silva JS, Coimbra JL, Tavares DG, Afonso GO. Inibição in vitro do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano. *Natureza on line* 2013; 11(1): 15-19.
- [26] Silva JRC, Souza RM, Zacarone AB, Silva LHCPS, Castro AMS. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas Syringaepv tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciênciaagrotecnologia*. 2008; 32(4): 1062-1072.
- [27] Rocha R. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib). *Brazil Journal of Microbiology* 2009; 40:73-78.
- [28] Louzada GAS, Carvalho DDC, Mello SCM, Lobo Júnior M, Martins I, Braúna LM. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. Originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotrop* 2009; 9(3): 145-149.