

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**Atividade herbicida de fungos
fitopatogênicos associados a
plantas do fragmento de
Mata Atlântica do Parque
Estadual do Rio Doce, Minas
Gerais, Brasil.**

Debora Luiza Costa Barreto

Ouro Preto
2020



UFOP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



DEBORA LUIZA COSTA BARRETO

Atividade herbicida de fungos fitopatogênicos associados a plantas do fragmento de Mata Atlântica do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Co-orientadora: Dra. Camila Rodrigues de Carvalho

Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais – ICB/UFMG

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

B273a Barreto, Debora Luiza Costa .
Atividade herbicida de fungos fitopatogênicos associados a plantas do
fragmento de Mata Atlântica do Parque Estadual do Rio Doce, Minas
Gerais, Brasil. [manuscrito] / Debora Luiza Costa Barreto. - 2020.
63 f.: il.: color., tab., mapa.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa.
Coorientadora: Dra. Camila Rodrigues de Carvalho.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Glifosato. 3. Herbicida. I. Carvalho,
Camila Rodrigues de. II. Rosa, Luiz Henrique. III. Universidade Federal de
Ouro Preto. IV. Título.

CDU 632

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589

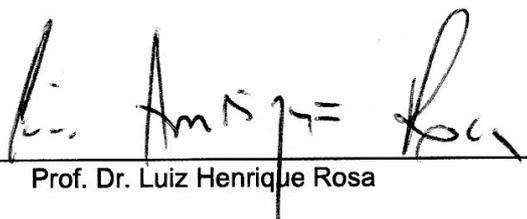


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

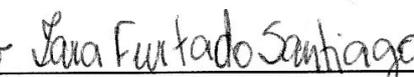
Aos 06 dias do mês de março do ano de 2020, às 15:00 horas, nas dependências da Universidade Federal de Minas Gerais, foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Debora Luiza Costa Barreto, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa (Presidente - Externo), pela Profa. Dra. Iara Furtado Santiago (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Mariana Costa Ferreira (Membro - Externo) e pela Profa. Dra. Camila Rodrigues de Carvalho (Co-Orientadora - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Atividade Herbicida de Fungos Fitopatogênicos Associados à Plantas do Fragmento de Mata Atlântica do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil", na área de concentração: Biotecnologia Industrial. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Profa. Dra. Iara Furtado Santiago; segundo Profa. Dra. Mariana Costa Ferreira; terceiro Profa. Dra. Camila Rodrigues de Carvalho; quarto Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 06 de março de 2020.



Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa
Presidente



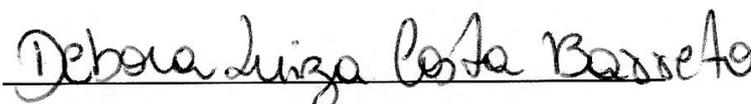
Profa. Dra. Camila Rodrigues de
Carvalho



Profa. Dra. Iara Furtado Santiago



Profa. Dra. Mariana Costa Ferreira



Mestranda

“There's always gonna be another mountain
I'm always gonna wanna make it move
Always gonna be an uphill battle
Sometimes I'm gonna have to lose
Ain't about how fast I get there
Ain't about what's waiting on the other side
It's the climb”

Miley Cyrus

AGRADECIMENTOS

A Deus, por escutar as minhas preces e ter me dado forças, saúde e sabedoria para chegar até aqui. Maria passa na frente!

Agradeço imensamente aos meus pais Sônia e Kiko, tio Valdir, vó Oliveira e meu irmão Hugo, por todo o apoio, carinho, orações e caronas.

Ao professor Luiz Rosa, pela oportunidade e por ter me proporcionando tantos aprendizados na área profissional.

A minha co-orientadora, Camila Carvalho, pela dedicação, ensinamentos, paciência e compreensão. Sem a sua ajuda essa conquista não seria possível. Devo muito a você.

A Zé, por sempre se mostrar disposta a ajudar quando precisei. Você é 10!

A Jéssica e Raissa, minhas primeiras amigas no lab, que mesmo hoje morando em cidades diferentes nossa amizade continua a mesma. Obrigada pelas horas de conversas e risadas.

A Rafaela, com quem mais compartilhei esses dois anos de mestrado. Foram muitos momentos tensos, mas sempre vividos com bom humor. Obrigada por sempre me incentivar.

A Marina Bahia, miga bandida, por todo apoio, ensinamentos, puxões de orelha, risadas e confissões no J4. Adoro você!

Aos amigos antárticos Lauren, Mayara, Thamar, Lívia, Matheus, Babi, Tetê, Eldon e Graci, pelas conversas e ajuda na bancada. Vocês foram essenciais.

Ao Michel, obrigada pela parceria, ter você em minha vida nesses últimos meses foi essencial para que o fim dessa jornada fosse mais leve.

A Mary, Geane e Bruna, pelo apoio dado desde a época da iniciação científica e o incentivo para que eu ingressasse no mestrado.

Aos meus filhos Negão Luiz (*in memorian*) e Francisco Luiz, por serem minha dose diária de alegria.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ BH (Betânia e Markus), pelas portas abertas e pela contribuição a esse trabalho.

A Universidade Federal de Ouro Preto e a Universidade Federal de Minas Gerais, pelo ensino gratuito e de qualidade.

A CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou meus estudos e pesquisas.

COLABORAÇÕES

Dra. Betânia Barros Cota

Dr. Markus Kohlhoff

Instituto René Rachou – FIOCRUZ/MG (BH)

Prof. Dr. João Renato Stehmann

Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

Lista de abreviações, símbolos e siglas	9
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	12
Resumo	13
Abstract.....	15
1. INTRODUÇÃO, RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Panorama atual da agricultura no Brasil	19
2.2 Ervas daninhas: resistência aos herbicidas e prejuízos à agricultura.....	19
2.3 Os herbicidas e seus mecanismos de ação	20
2.4 O uso do glifosato no Brasil e no mundo.....	23
2.5 Fungos fitopatogênicos e o uso de seus metabólitos como fonte de novos herbicidas...24	
3. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Área de coleta e obtenção das amostras.....	28
4.2 Processamento, isolamento e preservação dos fungos.....	29
4.3 Cultivo dos fungos para produção de extratos	29
4.4 Determinação da atividade herbicida.....	29
4.5 Identificação dos fungos bioativos	30
4.5.1 Extração do DNA total	30
4.5.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	31
4.5.3 Amplificação da região ITS	32
4.5.4 Purificação dos amplicons	32
4.5.5 Reações de sequenciamento.....	33
4.5.6 Análise computacional das sequências	34
4.6 Fracionamento dos extratos ativos.....	34
4.7 Análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).....	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Coleta, isolamento e preservação dos fungos fitopatogênicos.....	36
5.2 Determinação da atividade herbicida.....	37
5.3 Identificação dos fungos bioativos	40

5.4 Fracionamento dos extratos ativos.....	42
5.5 Análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).....	45
6. DISCUSSÃO.....	46
6.1 Isolamento dos fungos fitopatogênicos.....	46
6.2 Determinação da atividade herbicida.....	47
6.3 Identificação dos fungos bioativos	48
6.4 Fracionamento dos extratos herbicidas.....	50
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

Lista de abreviações, símbolos e siglas

°C: Graus Celsius

%: Por cento

µg/mL: Micrograma por mililitro

µL: Microlitro

AIPC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDA: Ágar Batata Dextrosado

BLASTn: Basic Local Alignment Search Tool

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CIM: Concentração Inibitória Mínima

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

H₂O: Água

HRAC: Comitê de Ação a Resistência aos Herbicidas

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

ITS: Região Transcrita Interna

km²: Quilômetro quadrado

LPCM: Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular

m: Metro

MeOH: Metanol

mg/mL: Miligrama por mililitro

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

M: Molar

NCBI: National Center for Biotechnology Information

OGM: Organismo Geneticamente Modificado

OMS: Organização Mundial da Saúde

p/v: Peso por volume

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PERD: Parque Estadual do Rio Doce

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: Picomol

rpm: Rotações por minuto

rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal

TBE: Tris borato

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

V: Volts

v/v: Volume por volume

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do glifosato e seu principal produto de degradação (AMPA).....	23
Figura 2. O triângulo da doença.....	24
Figura 3. Área do Parque Estadual do Rio Doce.....	27
Figura 4. Placas de CCD referente aos fracionamentos dos extratos ativos, sendo as respectivas frações 1: H ₂ O, 2: 25% MeOH, 3: 50% MeOH, Ex: extrato bruto, 4: 75% MeOH, 5: 100% MeOH, 6: 100% DCM. (A) <i>Xylaria</i> sp. 2 UFMGCB17649; (B) <i>Diaporthe</i> sp. 2 UFMGCB17744; (C) <i>Diaporthe</i> sp. 4 UFMGCB17905.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mecanismos de ação dos herbicidas existentes no mercado atual.....	20
Tabela 2. Local de coleta, espécimes vegetais amostrados e número de isolados de fungos fitopatogênicos recuperados de cada planta.....	35
Tabela 3. Atividade herbicida dos extratos brutos produzidos a partir dos fungos fitopatogênicos isolados de plantas doentes.....	38
Tabela 4. Atividade herbicida das frações obtidas a partir dos extratos ativos <i>Xylaria</i> sp. 2 UFMGCB17649, <i>Diaporthe</i> sp. 2 UFMGCB17744 e <i>Diaporthe</i> sp. 4 UFMGCB17905.....	40
Tabela 5. Identificação molecular dos fungos fitopatogênicos considerados ativos frente ao ensaio herbicida.....	43

Resumo

Com o aumento da população mundial e, conseqüentemente, o aumento da demanda por alimentos, as produções agrícolas vêm sendo sobrecarregadas em todo o mundo. As ervas daninhas são responsáveis por 60% das perdas nas plantações, tornando a agricultura dependente dos controles químicos. No entanto, com o uso indiscriminado, repetitivo e contínuo dos herbicidas, o número de plantas daninhas resistentes tem aumentado. Atualmente, existem vários tipos de herbicida disponíveis no mercado, mas todos eles possuem os mesmos mecanismos de ação dos lançados há 30 anos, o que justifica a resistência adquirida e leva os agricultores a aumentar a taxa de aplicação, colocando em risco à saúde humana e do meio ambiente. Pesquisas recentes demonstram que os metabólitos secundários produzidos por fungos são bastante promissores para o desenvolvimento de herbicidas naturais, pois exibem atividade em baixas concentrações, além de serem considerados mais seguros que os sintéticos. Os fungos fitopatogênicos, aqueles que causam doenças em plantas, vêm se destacando como produtores de substâncias herbicidas para uso na agricultura. Com isto, o presente estudo teve como objetivo isolar fungos fitopatogênicos a partir de lesões foliares de plantas com sinais de infecção coletadas no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Minas Gerais, Brasil, avaliar a atividade herbicida e identificar os isolados fúngicos bioativos. A partir de 27 plantas amostradas foram isolados 308 fungos. Extratos diclorometânicos foram produzidos a partir de todos os isolados, os quais foram testados na concentração de 1 mg/mL frente a sementes dos modelos de monocotiledônea (*Allium schoenoprasum* - cebolinha) e dicotiledônea (*Lactuca sativa* - alface crespa), a fim de avaliar seu potencial herbicida. Quinze fungos foram considerados ativos no ensaio, nove positivos frente a *L. sativa*, três frente a *A. schoenoprasum* e três para ambos os modelos. Três fungos apresentaram resultados significativos e se destacaram por inibir a germinação de todas as sementes de pelo menos um modelo alvo em baixas concentrações. *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 foi ativo na concentração de 125 µg/mL para o modelo de monocotiledônea, *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 e *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649 foram ativos na concentração de 500 µg/mL para o modelo de monocotiledônea e 250 µg/mL para o modelo de dicotiledônea, respectivamente. Os extratos de *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744, *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 e *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649 foram fracionados em cartucho C18 e as frações obtidas foram testadas no ensaio herbicida, demonstrando que foi possível separar as substâncias que possuíam atividade, pois apenas algumas frações tiveram resultado positivo no ensaio. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que os fungos

fitopatogênicos residentes em plantas da Mata Atlântica possuem a capacidade de produzirem metabólitos secundários com atividade herbicida, além da importância de se explorar tais metabólitos considerando serem fontes úteis para a descoberta de novos mecanismos de ação que podem ser utilizados para a formulação de herbicidas naturais.

Abstract

The world's population has increased and consequently the demand for food also, therefore the agricultural production has been overloaded worldwide. Weeds are responsible for 60% of plantation losses, making agriculture dependent on chemical controls. However, with the indiscriminate, repetitive and continuous use of herbicides, the number of resistant weeds has increased. Currently, there are several types of herbicide available on the market, but they all have the same mechanisms of action as those launched 30 years ago, which justifies the acquired resistance and leads farmers to increase the application rate, putting at risk to human health and of the environment. Recent research has shown that secondary metabolites produced by fungi are quite promising for the development of natural herbicides, as they exhibit activity in low concentrations, in addition to being considered safer than synthetic ones. Phytopathogenic fungi, those that cause diseases in plants, have been standing out as producers of herbicidal substances for use in agriculture. The present study aimed to isolate phytopathogenic fungi from leaf lesions of plants with signs of infection collected in the Rio Doce State Park (PERD), Minas Gerais, Brazil, to evaluate herbicidal activity and to identify bioactive fungal isolates. Three hundred eight fungi were isolated from 27 plants sampled. Dichloromethane extracts were produced from all isolates, which were tested at a concentration of 1 mg/mL against seeds of the monocotyledons (*Allium schoenoprasum* - chives) and dicotyledonous (*Lactuca sativa* - curly lettuce) models, in order to evaluate their herbicidal potential. Fifteen fungi were considered active in the assay, nine positive against *L. sativa*, three against *A. schoenoprasum* and three for both models. Three fungi showed significant results and stood out for inhibiting the germination of all seeds of at least one target model in low concentrations. *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 was active at a concentration of 125 µg/mL for the monocot model, *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 and *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649 were active at a concentration of 500 µg/mL for the monocot model and 250 µg/mL for the dicot model, respectively. *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744, *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 and *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649 were fractionated in a C18 cartridge and the fractions obtained were tested in the herbicide test, showing that it was possible to separate the substances that had activity, as only a few fractions had a positive result in the test. The results obtained in this work demonstrate that phytopathogenic fungi residing in plants of the Atlantic Forest have the ability to produce secondary metabolites with herbicidal activity, in addition to the importance of exploring such metabolites considering

they are useful sources for the discovery of new mechanisms of action that can be used for formulating natural herbicides.

1. INTRODUÇÃO, RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Atualmente, com o aumento da resistência das ervas daninhas frente aos herbicidas comercializados e a existência de estudos que comprovam a toxicidade dessas substâncias para o meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2015; RUTKOSKI et al., 2018) e para o ser humano (CREMONESE et al., 2017; LERMEN et al., 2018), faz-se necessária a busca por produtos menos tóxicos em comparação com os utilizados no momento atual na agricultura mundial. Uma alternativa para esse problema é o uso de fungos como fontes para produção de novos herbicidas, considerando que estes produzem substâncias naturais que são mais seguras e biodegradáveis para o uso na agricultura (CANTRELL et al., 2012).

Entre os fungos, o grupo definido como fitopatogênico produz fitotoxinas capazes de causar doenças em plantas, podendo levá-las a morte. Trabalhos recentes vêm demonstrando como essas substâncias são promissoras para a descoberta de novos fungicidas e herbicidas para uso na agricultura com novos mecanismos de ação (DUKE & DAYAN, 2011; SOUZA et al., 2017). Gêneros como *Alternaria*, *Colletotrichum* e *Phoma*, vêm se destacando como fungos fitopatogênicos produtores de substâncias herbicida para uso na agricultura (SINGH & PANDEY, 2019).

O Parque Estadual do Rio Doce, local de coleta das amostras avaliadas, possui o maior fragmento de mata Atlântica dentro do estado de Minas Gerais, sendo um bioma rico em diversidade, porém, bastante ameaçado pelas atividades humanas (INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS, 2019). O rompimento da barragem de Mariana em 2015 afetou drasticamente o Rio Doce, que passa por uma área de reserva do parque. Não se sabe ao certo como esse acidente afetou e afetará a comunidade microbiana nesse local, dessa forma, a realização de trabalhos de pesquisa na área descrita é extremamente relevante.

Considerando o importante papel do Brasil no agronegócio exterior, aliado ao fato do crescimento da sua economia depender fortemente desse setor, e por ser um dos países que mais consome agrotóxicos no mundo (FAO, 2016), a busca por herbicidas derivados de compostos naturais e sua fabricação dentro do país é de suma importância, pois a valorização da produção isenta de agrotóxicos irá garantir a segurança alimentar devido à diminuição de resíduos sintéticos nos alimentos, ocasionando assim menos impacto no meio ambiente e na saúde humana.

Diante do exposto, esse trabalho busca investigar o potencial de fungos fitopatogênicos associados a plantas do Parque Estadual do Rio Doce quanto à produção de

substâncias com atividade herbicida, como protótipos para a o desenvolvimento de herbicidas naturais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Panorama atual da agricultura no Brasil

Devido a sua grande extensão territorial, clima favorável e disponibilidade de recursos hídricos, o Brasil é hoje um dos principais produtores agrícolas do mundo e está entre os 10 maiores países exportadores de alimentos. Dos 8.515.770 km² de área que o país possui, 2.352.540 km² são destinados à agricultura (FAO, 2016). Atualmente, as principais culturas exportadas são algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, feijão, laranja, milho, soja, arroz e trigo (EMBRAPA, 2016).

A agricultura se tornou um importante pilar da economia brasileira, contribuindo para o desenvolvimento social e econômico do país (MATTHEY et al., 2004). De acordo com dados divulgados pelo IBGE (2019), no ano de 2018 o valor da produção agrícola resultou em R\$ 343,5 bilhões de reais, uma alta de 8,3% em relação ao ano de 2017. A expectativa é que a produção continue crescendo devido ao avanço das tecnologias e das pesquisas na área (PEREIRA et al., 2012).

A mecanização agrícola juntamente com o uso de fertilizantes, agrotóxicos e sementes geneticamente modificadas contribuíram para o aumento do rendimento das culturas (PINGALI, 2007). Entretanto, o uso intensivo dos agrotóxicos tem causado impactos no meio ambiente e na saúde humana, principalmente das pessoas que trabalham nas áreas rurais e que são diariamente expostas a esses químicos (CALDAS, 2016). Dessa forma, a busca por formas de controle naturais é essencial para o desenvolvimento sustentável da agricultura do país.

2.2 Ervas daninhas: resistência aos herbicidas e prejuízos à agricultura

Com o aumento da população mundial e, conseqüentemente, o aumento da demanda por alimentos, as produções agrícolas vêm sendo sobrecarregadas mundialmente. As lavouras são bastante acometidas com as pragas agrícolas, como ervas daninhas, insetos, micro-organismos, ácaros e nematoides, tornando-as, portanto, dependentes dos controles químicos (SCHREINEMACHERS & TIPRAQSA, 2012). Dentre as principais pragas que acometem a agricultura, as plantas daninhas são responsáveis pela maior parte das perdas, portanto, os herbicidas representam 60% dos pesticidas utilizados em todo o mundo (DAYAN, 2019). Conseqüentemente, com o seu uso indiscriminado, repetitivo e contínuo, o número de espécies resistentes tem aumentado. As ervas daninhas são aquelas plantas que não possuem

valor comercial, se disseminam facilmente, o que torna difícil o seu controle, e apresentam uma alta plasticidade fenotípica, atrapalhando o crescimento das que possuem interesse agrícola (VIGUEIRA et al., 2013). Além disso, competem com sucesso por recursos como nutrientes do solo, água e luz, ocasionando assim uma perda na produtividade e nos lucros (SINGH & PANDEY, 2019).

Em 2018, cerca de 495 biótipos de ervas daninhas, pertencentes a 255 espécies, foram descritas como resistentes aos herbicidas em todo o mundo e a tendência é que esse número cresça exponencialmente (HEAP & DUKE, 2018). Dessas espécies, 148 são dicotiledôneas e 107 são monocotiledôneas (HEAP, 2019). Essa resistência ocorre por meio da pressão seletiva, quando os biótipos sensíveis a herbicidas com certos mecanismos de ação são substituídos pelos biótipos resistentes, o que faz com que as plantas daninhas sobrevivam após a exposição de uma dose que seria letal para a população alvo e consigam se reproduzir passando o gene de resistência adiante (VAREJÃO et al., 2013; ADEGAS et al., 2017).

O prejuízo causado pelas plantas daninhas ao agronegócio brasileiro chega a valores de aproximadamente R\$ 9 bilhões por ano (ADEGAS et al., 2017). No Brasil, o primeiro relato de resistência a herbicida ocorreu no ano de 1993 com a espécie *Bidens pilosa* sendo resistente ao mecanismo de ação responsável por inibir a atividade da acetolactato sintase. Atualmente, já foram catalogadas 28 espécies de ervas daninhas resistentes a 10 mecanismos de ação diferentes; são elas *Amaranthus palmeri* (caruru-palmeri), *Amaranthus retroflexus* (caruru-gigante), *Amaranthus viridis* (caruru-de-mancha), *Ageratum conyzoides* (mentrasto), *Avena fatua* (aveia-selvagem), *Bidens pilosa* (picão-preto), *Bidens subalternans* (picão-preto), *Chloris elata* (capim-branco), *Conyza bonariensis* (buva), *Conyza canadensis* (buva), *Conyza sumatrensis* (buva), *Cyperus difformis* (junquinho), *Cyperus iria* (tiririca-do-brejo), *Digitaria ciliaris* (milhã), *Digitaria insularis* (capim-amargoso), *Echinochloa crus-galli* (capim-arroz), *Echinochloa crus-pavonis* (capim-arroz), *Echium plantagineum* (chupa-mel), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha), *Euphorbia heterophylla* (leiteiro), *Fimbristylis miliacea* (cuminho), *Lolium multiflorum* (azevém), *Oryza sativa* (arroz-vermelho), *Parthenium hysterophorus* (losna-branca), *Raphanus raphanistrum* (nabiça), *Raphanus sativus* (nabo), *Sagittaria montevidensis* (sagitária) e *Urochloa plantaginea* (papuã) (HEAP, 2019).

2.3 Os herbicidas e seus mecanismos de ação

A resistência das plantas daninhas frente aos herbicidas pode ser descrita de três formas: simples, quando a erva daninha é resistente a herbicidas pertencentes a um mesmo

grupo químico; resistência cruzada, quando a erva daninha é resistente a mais de dois herbicidas que possuem o mesmo mecanismo de ação, mas pertencem a grupos químicos diferentes; e resistência múltipla, quando a planta daninha é resistente a mais de dois herbicidas com mecanismos de ação distintos (KARAM et al., 2018).

O mecanismo de ação é o primeiro passo bioquímico/biofísico a ser inibido quando o herbicida entra em contato com a planta, ocasionando uma sequência de reações que ocorrem desde o primeiro contato até a sua ação final, levando a planta à morte (MARCHI et al., 2008). Atualmente, existem em torno de 20 mecanismos de ação dos herbicidas disponíveis no mercado (**Tabela 1**), os quais agem inibindo a produção de enzimas ou proteínas (DUKE, 2012).

De acordo com o Comitê de Ação a Resistência aos Herbicidas (HRAC), existem 25 grupos de herbicidas, classificados em letras de A a Z, sendo que os pertencentes ao grupo Z possuem mecanismos de ação ainda desconhecidos (HEAP, 2019).

Tabela 1. Mecanismos de ação dos herbicidas existentes no mercado atual.

Grupo	Mecanismo de ação	Exemplo de ingrediente ativo
B	Inibidores da acetolactato sintase (ALS)	Clorsulfurão
C1	Inibidores do fotossistema II	Atrazina
A	Inibidores da acetil-CoA carboxilase (ACCase)	Setoxidim
G	Inibidores da síntese de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP)	Glifosato
O	Síntese de Auxina	2,4-D
D	Desviador de elétrons do fotossistema I	Paraquat
C2	Inibidor do fotossistema II (ureias e amidas)	Clortolurão
E	Inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PPO)	Oxifluorfen
K1	Inibidores de microtúbulos	Trifluralina
N	Inibidores de lipídeos	Triallate
K3	Inibidores de ácidos graxos de cadeia longa	Butacloro
F3	Biossíntese de carotenoides	Amitrol
C3	Inibidores do fotossistema II (nitrilas)	Bromoxinil
F1	Inibidores da biossíntese de carotenoides	Diflufenicam
H	Inibidores da síntese de glutamina	Glufosinato
L	Inibidores de celulose	Diclobenil

Z	Inibidores de microtúbulos	Flamprop-metil
F2	Inibidores da p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD)	Isoxaflutol
F4	Inibidores DOXP	Clomazone
K2	Inibidores de mitose	Chlorpropham
Z	Desconhecido	Endothall
Z	Inibidores do alongamento celular	Difenzoquat
Z	Inibidores de ácido nucleico	MSMA

FONTE: HEAP (2019).

No Brasil, as plantas daninhas são resistentes a 10 dos mecanismos de ação conhecidos, muitas delas possuindo resistência múltipla, sendo inibidores da ALS, inibidores da ACCase, síntese de auxinas, inibidores da síntese de EPSP, inibidores da PPO, inibidores do fotossistema II, inibidores do fotossistema II (nitrilas), inibidores de celulose, desviador de elétrons do fotossistema I e inibidor do fotossistema II (ureias e amidas) (HEAP, 2019). Nenhum herbicida com mecanismo de ação diferente dos descobertos até o momento foi introduzido no mercado nos últimos 30 anos (DUKE, 2012). Isso se deve a três fatores econômicos. O primeiro é a introdução do herbicida glifosato e das culturas transgênicas resistentes ao glifosato, ambos sendo bastante vantajosos para o agronegócio, o que ocasionou uma estagnação no mercado global de produção de novos herbicidas devido à desvalorização dos mesmos (DUKE, 2018). Além disso, em 2000, a patente do glifosato expirou, fazendo com que seu preço no mercado diminuísse e tornasse mais acessível para os agricultores (GIANESSI, 2008). O segundo motivo é a redução dos grupos de pesquisa na área devido ao fator citado anteriormente juntamente com a preocupação decorrente do impacto desses produtos no meio ambiente, o que tornou seus registros mais rigorosos (PETERS & STREK, 2018). O terceiro motivo se deve ao aumento do custo para trazer um novo herbicida sintético para o mercado, sendo de US\$ 184 milhões no ano 2000 e 286 milhões no ano de 2016 (MCDUGALL, 2016).

Dos mecanismos de ação mencionados anteriormente, apenas dois são derivados de produtos naturais, o inibidor da síntese de glutamina e o inibidor da enzima p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (DUKE & DAYAN, 2015). O HPPD foi o último mecanismo de ação lançado no mercado, e atualmente, já foi relatado algumas ervas daninhas resistentes a esta formulação (HAUSMAN et al., 2011). A solução para eliminar plantas

daninhas resistentes seria a aplicação de um herbicida com um novo mecanismo de ação, dessa forma, a descoberta por novos herbicidas é extremamente necessária para mitigar os prejuízos causados no agronegócio e que sejam menos danosos para o meio ambiente e saúde humana.

2.4 O uso do glifosato no Brasil e no mundo

O glifosato (N-(phosphonomethyl)-glycine) é um herbicida não seletivo e de amplo espectro que foi introduzido no mercado no ano de 1974 pela empresa Monsanto e hoje o mais utilizado no mundo. Em 2014, 747 milhões quilogramas de glifosato foram utilizados mundialmente (BENBROOK, 2016). Este herbicida, além de ser usado na agricultura para o controle de ervas daninhas, ele é bastante utilizado com outras finalidades, como para dessecação de culturas de grãos, adiantando e facilitando a colheita (JASKULSKI & JASKULSKA, 2011), em áreas urbanas para o controle de plantas daninhas em estradas, ruas e parques (HANKE et al., 2010) e também utilizado em curso de água para eliminar plantas aquáticas invasoras (MONSANTO, 2014).

Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) na via metabólica do ácido shikimato, a qual inibe a síntese dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, interferindo na produção de moléculas que são promotoras de crescimento e de defesa para as plantas (LYDON & DUKE, 1988; BECERRIL et al., 1989). O glifosato começa a agir após ser absorvido pelas folhas, sendo transportado para todas as partes das plantas, ocasionando sua morte em alguns dias (HELANDER et al., 2012). Por ser um herbicida de amplo espectro capaz de matar todo o tipo de vegetação (exceto as culturas transgênicas resistentes ao glifosato), sua aplicação é realizada antes do plantio das culturas de interesse para eliminar a vegetação não desejada; sua aplicação também pode ser feita em culturas transgênicas resistentes já cultivadas em casos de emergência (REDDY et al., 2010).

A introdução das culturas transgênicas resistentes ao glifosato em 1996 levou ao aumento do uso desse herbicida nos locais onde a produção de organismos geneticamente modificados (OGM) são liberados (JAMES, 2008). De acordo com Duke (2018), 90% das culturas transgênicas no mundo são resistentes a herbicidas e a maioria delas resistente ao glifosato.

O glifosato possui uma molécula de difícil degradação devido a ligação de C-P presente em sua estrutura. Esse processo de decomposição é realizado por comunidades de

A propagação dos fungos fitopatogênicos pode ocorrer de várias maneiras, sendo a mais comum por meio da dispersão dos esporos. Quanto à infecção fúngica, o primeiro passo é a adesão do seu esporo na superfície da planta, pois sem a aderência ele pode ser facilmente dispersado, seja pelo vento ou pela chuva e essa forma de adesão irá variar de acordo com a espécie (IDNURM & HOWLETT, 2001). O segundo passo para a infecção é a germinação do esporo, dado pelo crescimento do tubo germinativo. Essas duas etapas são consideradas as principais para o controle desses fitopatógenos na agricultura (IKEDA et al., 2019).

De acordo com Moller e colaboradores (2017), os fungos fitopatogênicos possuem algumas estratégias de infecção, podendo ser considerados necrotróficos quando matam seu hospedeiro por meio da liberação de toxinas e enzimas para obter nutrientes para serem utilizados no crescimento e reprodução; biotróficos quando adquirem seus nutrientes das células vegetais vivas, manipulando as defesas do hospedeiro; ou hemibiotróficos quando exibem características de necrotrofia e biotrofia.

Um termo clássico em fitopatologia, “o triângulo da doença” (**Figura 2**), mostra que cada ponta irá representar um fator favorável para o desenvolvimento da patologia na planta, são eles um hospedeiro suscetível, um patógeno, e um ambiente propício para o desenvolvimento da doença, como chuvas frequentes ou prolongadas, alta umidade e temperatura moderada. Para que a planta fique doente, esses três fatores precisam estar presentes ao mesmo momento (FRANCL, 2001).

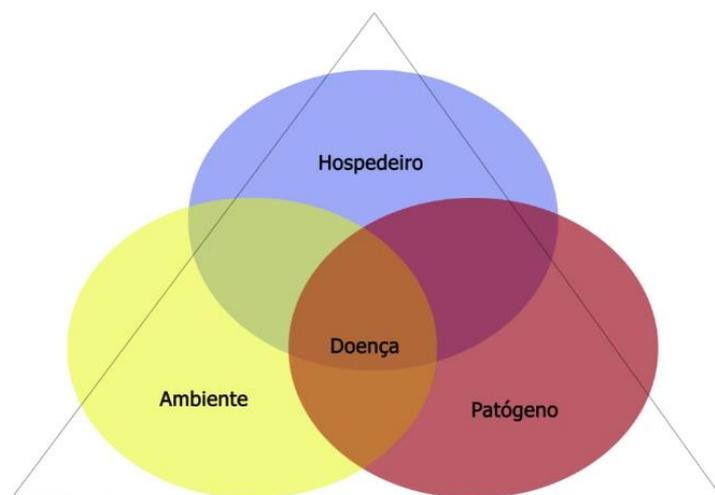


Figura 2. O triângulo da doença. FONTE: Adaptado de FRANCL (2001).

Os fungos produzem um grande número de metabólitos pertencentes a diferentes grupos químicos, e atualmente, as fitotoxinas produzidas por esses fitopatógenos estão sendo amplamente estudadas como fonte de metabólitos biologicamente ativos para descoberta de novos mecanismos de ação (CIMMINO et al., 2015). Herbicidas derivados de produtos naturais são considerados mais seguros do que os sintéticos convencionais e são atraentes, pois exibem bioatividade em baixas concentrações (DAYAN & DUKE, 2014).

Alguns estudos já demonstraram o isolamento de substâncias com potencial atividade herbicida a partir de fungos fitopatogênicos. A partir do fungo *Ascochyta agropyrina*, patógeno da planta *Elitrigia repens*, foram isolados e caracterizados três produtos naturais, denominados agropirenenol, agropirenenal e agropirenenona. Estas substâncias foram testadas frente a três espécies de ervas daninhas, *Chenopodium album* e *Mercurialis annua* (dicotiledôneas) e *Setaria viridis* (monocotiledônea), na concentração de 2 mg/mL. O agropirenenona foi inativo e o agropirenenal foi menos ativo. Já o agropirenenol causou lesões necróticas nas folhas das ervas daninhas testadas em apenas um dia, comprovando sua fitotoxicidade e demonstrando ser bastante promissor (ANDOLFI et al., 2012).

No estudo de Meepagala e colaboradores (2016), o fungo *Curvularia intermedia* foi isolado a partir de uma folha da planta *Pandanus amaryllifolius* exibindo necrose. O extrato bruto de *C. intermedia* apresentou atividade para os modelos de monocotiledônea (*Agrostis stolonifera*) e dicotiledônea (*Lactuca sativa*) no ensaio herbicida na concentração de 1 mg/mL. Quando analisado em cromatografia de camada delgada (CCD), o extrato apresentou dois metabólitos majoritários e suas respectivas frações fitotóxicas inibiram a germinação das sementes no bioensaio. Essas substâncias foram purificadas e identificadas como curvularina e $\alpha\beta$ -desidrocurvularina.

3. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial herbicida de fungos fitopatogênicos isolados a partir de plantas com sintomas de doença coletadas em fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais, no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar folhas com sintomas de infecção de espécimes vegetais e isolar os fungos fitopatogênicos presentes nas lesões foliares;
- Depositar todos os isolados fúngicos obtidos na Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais para preservação *ex situ* da biodiversidade;
- Preparar os extratos brutos diclorometânicos a partir das culturas fúngicas;
- Verificar a atividade herbicida dos extratos frente as sementes de *Lactuca sativa* e *Allium schoenoprasum*;
- Identificar os fungos que apresentaram atividade no bioensaio utilizando técnicas de taxonomia molecular;
- Submeter os extratos ativos a um fracionamento químico monitorado para atividade herbicida;
- Identificar os metabólitos bioativos presentes nas frações ativas por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Performance e comparação no banco de dados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de coleta e obtenção das amostras

A coleta dos espécimes vegetais foi realizada no Parque Estadual do Rio Doce, que está inserido dentro dos municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo, localizados na região do Vale do Aço (**Figura 3**), Minas Gerais, Brasil. O PERD foi fundado em 1944, e é considerado a área de conservação que possui o maior fragmento de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais, com um total de 35.970 hectares. O parque abriga uma grande diversidade de flora e fauna, com destaque para as árvores centenárias e madeiras nobres de grande porte, além de possuir quarenta lagoas. Nas instalações do parque funcionam um herbário e um banco de sementes, o que é importante para o desenvolvimento das pesquisas realizadas no local (INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS, 2019).

As coletas foram realizadas nas trilhas pertencentes ao PERD e no entorno da sede. Foram coletadas cinco plantas na trilha do Vinhático ($19^{\circ}45'91''\text{S}$, $42^{\circ}37'42''\text{W}$), 10 plantas na trilha da Campolina ($19^{\circ}42'19''\text{S}$, $42^{\circ}30'45''\text{W}$), oito mudas no viveiro do parque e quatro plantas no entorno da sede do parque, totalizando 27 espécimes vegetais, todos possuindo sintomas de infecção. As amostras obtidas foram armazenadas em sacos plásticos e processadas em laboratório após três dias.

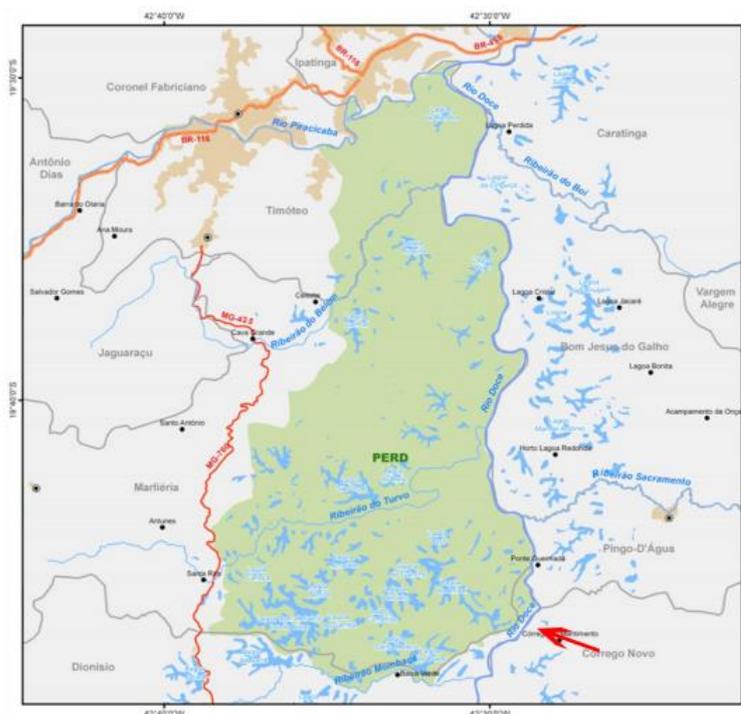


Figura 3. Área do Parque Estadual do Rio Doce. FONTE: <https://raizesdomundo.com/wp-content/uploads/2016/07/parque-rio-doce.png>

4.2 Processamento, isolamento e preservação dos fungos

O processamento das amostras foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meepagala e colaboradores (2016), com modificações. Inicialmente, as plantas foram lavadas em água corrente para a eliminação de resíduos do solo e do ar e secas em papel toalha. Posteriormente, com o auxílio de um bisturi, a parte do tecido foliar que continha o sintoma foi dividida em cinco fragmentos de aproximadamente 1 cm, os quais foram submetidos a um processo de desinfestação superficial com hipoclorito de sódio 0,5% v/v por cinco minutos e lavagem em água destilada autoclavada por três vezes. Após esta etapa, os fragmentos foram plaqueados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) (Sigma) suplementado com 100 µg/mL de cloranfenicol (Sigma) para evitar o crescimento de culturas bacterianas. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C por sete dias até o aparecimento de colônias, que foram purificadas sendo transferidas para uma nova placa contendo meio BDA e incubadas sob as mesmas condições mencionadas. Os isolados fúngicos obtidos foram preservados em duplicata, em água destilada autoclavada e armazenados à temperatura ambiente pelo método de Castellani (1967), e em glicerol 15% v/v armazenados à -80 °C, e então depositados na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG sob o código UFMGCB.

4.3 Cultivo dos fungos para produção de extratos

Para a obtenção dos extratos fúngicos, cada isolado foi inoculado separadamente em quatro placas de Petri 90x15 mm contendo 20 mL de meio BDA e em seguida incubadas por 15 dias em BOD a 25 °C. Posteriormente, o conteúdo das placas (meio de cultura com o crescimento micelial) foi fragmentado em pequenos pedaços, colocados em frascos de vidro tipo erlenmeyers de 125 mL, congelados a -20 °C por 24h e então submetidos ao processo de liofilização (Liofilizador LíoTop – K105) por 5 dias. Seguidamente, a cada erlenmeyer foram adicionados 100 mL de Diclorometano P.A. (Neon), e mantidos em repouso por sete dias à temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante de cada frasco (fase diclorometânica) foi filtrado com auxílio de papel filtro (50 x 50 – 80g) e transferido para frascos de cintilação previamente pesados (ROSA et al., 2013). Após o extrato ter sido seco em capela de exaustão, os mesmos foram armazenados a -4 °C até a realização do bioensaio.

4.4 Determinação da atividade herbicida

O ensaio de determinação da atividade herbicida foi realizado de acordo com a metodologia de Gomes et al. (2018). Os extratos fúngicos foram testados frente às sementes

de alface crespa (*Lactuca sativa*) e cebolinha (*Allium schoenoprasum*), modelos de dicotiledônea e monocotiledônea, respectivamente. As sementes foram desinfestadas com álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 2,5% por sete minutos e 30 segundos, lavadas em água destilada esterilizada por quatro vezes e secas dentro do fluxo laminar em papel filtro esterilizado. O ensaio foi realizado em duplicata sendo utilizadas placas de 24 poços contendo em cada poço um disco de papel filtro. Aos respectivos poços foram adicionados 400 µL do herbicida glifosato (Sigma) na concentração de 3 mg/mL como controle positivo, 400 µL de água destilada esterilizada como controle negativo, 400 µL de acetona diluída em água destilada esterilizada como controle do solvente (360 µL de água e 40 µL de acetona), e 400 µL dos extratos brutos diluídos em acetona a 1 mg/mL (360 µL de água e 40 µL do extrato em acetona). Em seguida, em todos os poços foram distribuídas 5 sementes de alface crespa ou cebolinha. As placas foram seladas e armazenadas em BOD com luz contínua na temperatura de 26 °C. O resultado foi avaliado após 10 dias de incubação para *L. sativa* e 14 dias para *A. schoenoprasum*. Uma estimativa qualitativa foi realizada, atribuindo uma escala de 0 (todas as sementes germinaram) a 5 (nenhuma semente germinou).

Os extratos que inibiram a germinação das sementes em 100% foram submetidos ao ensaio para cálculo da concentração inibitória mínima (CIM). Diluições seriadas dos extratos, de 1000 até 3,9 µg/mL foram realizadas. Os controles foram utilizados conforme mencionado acima.

4.5 Identificação dos fungos bioativos

Os fungos que apresentaram atividade no ensaio herbicida foram agrupados de acordo com suas características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda. Os grupos formados foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR microsatélite utilizando o iniciador GTG₅. Os isolados que apresentaram o padrão das bandas idêntico foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo e então um isolado foi selecionado para sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região gênica do rRNA.

4.5.1 Extração do DNA total

O procedimento utilizado para a extração de DNA total dos fungos filamentosos foi o proposto por Rosa e colaboradores (2009), com modificações. Os fungos foram cultivados por sete dias em meio BDA, posteriormente, uma parte do micélio foi retirada e colocada em

tubos eppendorfs de 2,0 mL. Quatrocentos microlitros de tampão de lise (Tris-HCl - trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) foram adicionados até cobrir o micélio e congelados a -20 °C até o momento da extração. Três beads de aço inoxidável (3 mm de diâmetro) foram adicionadas a cada tubo e os micélios foram triturados no microdesmembrador *Next Advance Bullet Blender*® por 5 minutos, em rotação máxima por três vezes. Em seguida, foi adicionado 162 µL de CTAB de Hoog (Tris 2 M, NaCl 8,2%, EDTA 2 M e CTAB 0,2%), feito uma homogeneização em vórtex e incubado por 30 minutos a 65 °C. Posteriormente, foi acrescentado 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizado em vórtex e incubado por 30 minutos a 0 °C. O produto foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL estéril. Em seguida foi adicionado acetato de sódio 3M na proporção de 10% do volume de cada tubo, os quais foram homogeneizados por inversão 10 vezes, incubados a 0 °C por 30 minutos e, então, centrifugados a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL e foi adicionado 50% de isopropanol (Sigma) referente ao conteúdo do tubo, homogeneizado por inversão e deixado a temperatura ambiente durante 60 minutos para precipitar o DNA. Os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante descartado por inversão, seguido por homogeneização com 200 µL de etanol 70% (Merck) p/v gelado para lavar o DNA e remover as impurezas. Essa etapa foi repetida duas vezes. O sobrenadante foi descartado por inversão e as amostras foram secas *overnight*. No dia seguinte foi adicionado 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). As amostras foram incubadas a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA e, posteriormente, armazenadas em freezer a -20 °C.

4.5.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

De acordo com Lieckfeldt e colaboradores (1993), foi utilizado o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') para a amplificação das regiões de microssatélite. A PCR foi realizada utilizando 2,0 µL do iniciador (GTG)₅ 10 pmol (Invitrogen), 2,5 µL de tampão de PCR (10x) (Sinapse Inc), 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 M (Sinapse Inc), 1,0 µL de dNTP 0,05 mM (Sinapse Inc), 1,0 µL de betaína (Sigma), 0,5 µL de DMSO (Sigma), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (1,25 U) (Sinapse Inc), 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), e o volume final foi completado com água para injeção esterilizada, totalizando 25 µL. As reações de PCR foram realizadas

utilizando o termociclador *Mastercycler* (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 93 °C, um minuto de anelamento a 50 °C e um minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por seis minutos a 72 °C. Os amplicons obtidos por meio da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sendo as bandas coradas com solução de GelRed (Biotium). O gel foi imerso em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos por aproximadamente 90 minutos a 80 V, e visualizados sob luz ultravioleta.

4.5.3 Amplificação da região ITS

Para amplificação da região ITS do rRNA foi aplicada a metodologia descrita por White et al. (1990) utilizando-se os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). A PCR foi realizada utilizando 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 pmol (Invitrogen), 5,0 µL de tampão de PCR (10x) (Thermo Scientific), 3,0 µL de MgCl₂ 1,5 M (Thermo Scientific), 2,0 µL de dNTP 0,05 mM (Sinapse Inc), 2,0 µL de betaína (Sigma), 1,0 µL de DMSO (Sigma), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (1,25 U) (Thermo Scientific), 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), e o volume final foi completado com água para injeção esterilizada, totalizando 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador *Mastercycler* (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido por 35 ciclos de um minuto de desnaturação a 94 °C, um minuto de anelamento a 55 °C e um minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por cinco minutos a 72 °C. Os amplicons obtidos por meio da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta.

4.5.4 Purificação dos amplicons

Os amplicons obtidos a partir da reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto de PCR com volume de 47 µL foi adicionado o volume de 11,75 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol absoluto (Merck), sendo homogeneizado e mantido por 15 minutos em repouso para a precipitação do DNA. Esta mistura foi centrifugada a 13.000 rpm

por 25 minutos, o sobrenadante foi descartado, e ao precipitado foi adicionado 120 μL de etanol 70%, seguido de homogeneização por inversão. Outra centrifugação foi realizada a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado e o restante do etanol foi seco. O DNA foi ressuscitado em 10 μL de água para injeção esterilizada, sendo dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

4.5.5 Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM) do Instituto René Rachou/Fiocruz MG, utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA), em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 μL , em que foram adicionados: 1 μL do iniciador ($5 \mu\text{mol}^{-1}$), 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μL de Big Dye, 1 a 5 μL de DNA (de modo que a reação final contenha entre 5-20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por um minuto, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e quatro minutos de extensão final a 60 °C. Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação, sendo adicionados 1 μL de EDTA a 125 mM, 1 μL de acetato de amônio 3M e 50 μL de etanol 96% (Merck) em cada poço. A placa foi homogeneizada brevemente com auxílio de um vórtex e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 rpm à 4 °C e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 μL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 rpm durante um segundo. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20 minutos para evaporação do etanol residual. O DNA das amostras precipitado em cada poço foi então ressuscitado em 10 μL de Formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA).

4.5.6 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA dos fungos fitopatogênicos foram comparadas com as sequências de espécies tipo depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool* – versão 2.215 do BLAST 2.0 disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology*. Para os fungos que apresentaram sequências com valor de e-value (E) = 0, cobertura e identidade $\geq 99\%$ foram considerados como pertencentes à mesma espécie, os fungos com sequências com valor de E diferente de zero, cobertura e identidade $\leq 98\%$ foram identificados em nível de gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética (GODINHO et al., 2013). Para identificação molecular foram utilizadas as sequências ≥ 350 pares de bases. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>).

4.6 Fracionamento dos extratos ativos

O fracionamento foi feito utilizando o cartucho Chromabond C18ec de 500 mg (Macherey-Nagel, Alemanha), que foi ativado com 3 mL de metanol grau HPLC (JT Baker, EUA), seguido de 3 mL de água Milli-Q. Os extratos brutos foram solubilizados em 500 μL de uma mistura de MeOH:CH₂Cl₂ (70:30 v/v) e incorporados ao cartucho. Posteriormente, foram obtidas seis frações, que foram eluídas utilizando-se um total de 9 mL de misturas de concentrações crescentes de metanol em água Milli-Q (100 %, 75 %, 50 % e 25 %), seguido de 100% de água Milli-Q, e por fim, 100% de diclorometano (JT Baker, EUA). Das seis frações coletadas, uma parte foi utilizada para a verificação da atividade herbicida, sendo testadas nas respectivas concentrações do CIM a qual cada extrato bruto foi considerado ativo, e outra parte destinada para análises em cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LS-MS). Para a análise em CCD, as frações foram aplicadas nas cromatoplasas (0.25 mm, sílica gel G-60/F254, Merck, Alemanha) através de tubos capilares de vidro e eluídas em cubas cromatográficas com mistura de hexano e diclorometano (Synth PA, Brasil) na proporção de 1:1 v/v. As placas foram pulverizadas com uma mistura dos reagentes vanilina 1% p/v e ácido sulfúrico 10% v/v em etanol absoluto na proporção de 1:1, aquecidas a 110 °C por 5 minutos e posteriormente visualizadas e interpretadas (WAGNER, 1996).

4.7 Análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)

Essa análise foi executada por técnicos especializados pertencentes ao Grupo de Pesquisa Química de Produtos Naturais Bioativos/Fiocruz MG. A análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi realizada em cromatógrafo UHPLC modelo Nexera (Shimadzu) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução modelo maXis ETD ESI-qTOF (Bruker) controlado pelo software Compass 1.5 (Bruker). As frações foram diluídas em acetonitrila (5mg/mL) e 3 µL da solução foram injetados em coluna Shim-Pack XR-ODS-III (partícula 2,2 µm; 2,0 X 150mm) a 40 °C e fluxo de 400 µL/min. A fase móvel foi constituída de A e B (A= água e B= acetonitrila ambas com 0,1% ácido fórmico) onde os 5 min iniciais com 5%B. em seguida, um gradiente linear de 5-100% em 40 min. Os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo na razão de 5Hz. A fonte de íon foi ajustada para 500 V e a voltagem do capilar para 4500 V. A pressão do gás nebulizador foi de 3,0 bar com fluxo de 8L/min a 200 °C. Os espectros com fragmentação automática (aquisição dependente de dados) foram registrados utilizando energia de colisão entre 15 e 60 eV. A detecção dos íons foi realizada no intervalo de m/z 100-1500. Como solução de calibração foi utilizado formato de sódio (1mM) em 2-propanol (50%). Os cromatogramas foram analisados por algoritmos que separam os picos com subseqüente determinação das fórmulas elementar de acordo com o padrão de massa isotópica (MS1) utilizado o programa *Data Analysis* (Bruker) e *Target Analysis*.

5. RESULTADOS

5.1 Coleta, isolamento e preservação dos fungos fitopatogênicos

Dentre as trilhas Vinhático e Campolina, foi possível identificar seis espécies. Na trilha do Vinhático, apenas uma foi identificada, a qual pertence à família *Fabaceae* (Lindl.). Das plantas coletadas na trilha da Campolina, cinco foram identificadas, *Erythrochiton brasiliensis* (Nees & C. Mart.) e espécimes pertencentes às famílias *Bignoniaceae* (Juss.), *Sapindaceae* (Juss.), *Poaceae* (Rchb.) e ao gênero *Ficus* (L.). As mudas coletadas no viveiro do parque foram *Joannesia princeps* (Vell.) (Cutieira), *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (Ipê Amarelo), *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (Ipê Roxo), *Hymenaea courbaril* (L.) (Jatobá), *Swietenia macrophylla* (King.) (Mogno), *Lecythis pisonis* (Cambess.) (Sapucaia) e *Bixa orellana* (L.) (Urucum). Das quatro plantas coletadas no entorno da sede, três são indivíduos adultos de Cutieira, Mogno e Sapucaia (**Tabela 2**).

A identificação das mudas coletadas no viveiro foi realizada por meio de um catálogo disponibilizado pela secretaria do parque. Para a identificação dos indivíduos coletados nas trilhas do Vinhático e Campolina, uma parte do material foi seca em estufa e posteriormente foram identificados pelo professor Dr. João Renato Stehmann, Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais. Não foi possível realizar a identificação dos demais espécimes amostrados devido ao grau de adoecimento em que se encontravam, logo foram nomeadas de D1 a D10. As plantas coletadas não foram herborizadas devido às condições de adoecimento. Ao final do processamento foram obtidos 308 fungos filamentosos a partir dos 135 fragmentos foliares processados.

Tabela 2. Local de coleta, espécimes vegetais amostrados e número de isolados de fungos fitopatogênicos das plantas amostradas.

Local de coleta	Planta Hospedeira	Número de isolados
Trilha Campolina	<i>Poaceae</i> Rchb.	5
	D1	9
	D2	10
	<i>Erythrochiton brasiliensis</i> Nees & C. Mart.	11
	D3	11
	<i>Sapindaceae</i> Juss.	13
	<i>Bignoniaceae</i> Juss.	13
	<i>Ficus</i> sp. L.	13
	D4	14

	D5	18
Trilha Vinhático	<i>Fabaceae</i> Lindl.	4
	D6	9
	D7	11
	D8	12
	D9	15
Mudas Viveiro	<i>Handroanthus impetiginosus 1</i> (Mart. ex DC.) Mattos	7
	<i>Hymenaea courbaril</i> L.	8
	<i>Lecythis pisonis</i> Cambess.	12
	<i>Bixa orellana</i> L.	13
	<i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Mart. ex DC.) Mattos	14
	<i>Handroanthus impetiginosus 2</i> (Mart. ex DC.) Mattos	14
	<i>Swietenia macrophylla</i> King.	17
	<i>Joanesia princeps</i> Vell.	19
Plantas coletadas no entorno do parque	<i>Joanesia princeps</i> Vell.	6
	<i>Lecythis pisonis</i> Cambess.	6
	<i>Swietenia macrophylla</i> King.	8
	D10	16
Total	-	308

5.2 Determinação da atividade herbicida

Trezentos e oito extratos fúngicos diclorometânicos foram produzidos e testados frente sementes de alface crespa (*L. sativa*) e cebolinha (*A. schoenoprasum*), a fim de verificar sua atividade herbicida. Os resultados foram avaliados qualitativamente e considerados ativos os extratos com capacidade de inibição igual ou superior a 3 da média das respectivas sementes. Vinte e oito extratos (9%) apresentaram atividade frente a pelo menos uma semente. Destes, 18 (64%) inibiram somente a germinação de *L. sativa* e cinco (18%) somente de *A. schoenoprasum*. Além disso, cinco extratos (18%) foram ativos para ambas as sementes. Os extratos considerados positivos na triagem foram novamente produzidos a partir do re-cultivo do fungo e submetidos a um novo ensaio herbicida a fim de confirmar a atividade biológica. Após o novo ensaio, 15 extratos mantiveram sua atividade (**Tabela 3**).

Dos 15 extratos ativos no reteste, 12 foram positivos frente ao modelo de dicotiledôneas (*L. sativa*) e seis positivos frente ao modelo de monocotiledôneas (*A. schoenoprasum*). Três destes extratos apresentaram atividade frente ambos os modelos estudados, o que é bastante interessante, sugerindo um amplo espectro de ação herbicida. Em contrapartida, nove extratos apresentaram atividade somente frente *L. sativa* e três

apresentaram atividade somente frente *A. schoenoprasum*, sugerindo que estes extratos apresentaram uma possível seletividade quanto à atividade herbicida desempenhada.

Dentre os 15 extratos ativos no reteste, aqueles obtidos do cultivo de *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649, *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 e *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 inibiram 100% a germinação das sementes de pelo menos um dos modelos avaliados, demonstrando possuir um forte efeito fitotóxico. Destes, os extratos dos fungos *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649 e *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 inibiram a germinação de todas as sementes de ambos os modelos e *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 inibiu a germinação de todas as sementes de cebolinha, tanto na triagem inicial quanto no reteste, demonstrando-se serem estáveis e promissores (**Tabela 3**).

Os extratos *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649, *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 e *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 foram selecionados e submetidos ao ensaio para cálculo da concentração inibitória mínima (CIM), sendo avaliados na faixa de 1000 a 3,9 µg/mL. *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649 e *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 inibiram a germinação das sementes de cebolinha a uma concentração de 500 µg/mL e as sementes de alface crespa a 250 µg/mL. Já o extrato *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 inibiu a germinação das sementes de cebolinha na concentração de 125 µg/mL.

Tabela 3. Atividade herbicida dos extratos brutos produzidos a partir dos fungos fitopatogênicos isolados de plantas doentes.

Planta Hospedeira	UFMGCB ^a	Atividade herbicida (Triagem)		Atividade herbicida (Reteste)	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>
<i>Hymenaea courbaril</i>	17692	-	3±1	-	3±1
<i>Swietenia macrophylla</i>	17744	-	5±0	-	5±0 (125 µg/mL)
<i>Swietenia macrophylla</i>	17747	3±0	-	3±1	-
D9	17905	5±0	5±0	5±0 (250 µg/mL)	5±0 (500 µg/mL)
D7	17919	3±0	-	3±1	-
D5	17767	4,5±0,5	-	4,5±0,5	-
D5	17769	4,5±0,5	4±0	4,5±0,5	1±0
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	17649	5±0	5±0	5±0 (250 µg/mL)	5±0 (500 µg/mL)
<i>Sapindaceae</i>	17867	4,5±0,5	-	3,5±0,5	-
D7	17921	-	3±0	-	3±1
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	17656	4±0	-	3,5±1,5	-
<i>Hymenaea courbaril</i>	17688	3±0	-	4±0	-
D5	17774	3,5±1,5	-	3,5±1,5	-
D3	17853	3±0	-	3±0	-
<i>Poaceae</i>	17873	4±0	3±0	3±1	3±0
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	17652	3,5±1,5	-	2±0	-
<i>Lecythis pisonis</i>	17711	3,5±0,5	-	1,5±0,5	-
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	17680	3±0	3±1	1,5±0,5	1,5±0,5
<i>Swietenia macrophylla</i>	17743	3±0	-	2±0	-
D6	17935	-	3±0	-	1±0
D7	17923	-	4±0	-	1,5±0,5
D5	17761	3,5±0,5	-	2,5±0,5	-
<i>Bignoniaceae</i>	17781	4,5±0,5	-	1,5±0,5	-
<i>Erythrochiton brasiliensis</i>	17836	3±1	-	1±0	-
<i>Erythrochiton brasiliensis</i>	17840	3±0	-	1±0	-
D3	17857	4±0	-	2,5±0,5	-
<i>Sapindaceae</i>	17869	3±1	-	2,5±0,5	-
<i>Poaceae</i>	17875	3±0	-	2±1	-
Glifosato	-	5±0	5±0	5±0	5±0

A estimativa qualitativa da fitotoxicidade foi realizada atribuindo uma escala de 0-5, onde 0 = todas as sementes germinaram/nenhum efeito e 5 = nenhuma semente germinou ± desvio padrão. Plantas alvo: *Lactuca sativa* = alface crespa, *Allium schoenoprasum* = cebolinha. Em negrito, os valores selecionados para o cálculo da concentração inibitória mínima e em parêntese os valores da concentração inibitória mínima (µg/mL). ^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. (-) Resultado negativo.

5.3 Identificação dos fungos bioativos

Os 15 fungos produtores de substâncias herbicidas foram selecionados para identificação molecular, os quais foram inicialmente agrupados em sete morfotipos de acordo com suas características macromorfológicas. Destes, quatro não agruparam, ocorrendo como apenas um único isolado. Os isolados pertencentes a um mesmo grupo morfológico foram submetidos à amplificação das regiões de microssatélite para confirmação do agrupamento morfológico. Após o (GTG)₅, os isolados foram reagrupados em treze grupos. Um isolado de cada grupo molecular foi selecionado para sequenciamento da região ITS do gene do rRNA. As sequências obtidas quando comparadas as depositadas no *GenBank* possibilitaram a identificação ao menos em nível de gênero (**Tabela 4**). Cinco isolados (33%) não foram identificados, pois não foi possível obter a amplificação de nenhuma das regiões propostas ou sequências de qualidade satisfatória. Dos fungos identificados, todos pertencem ao filo *Ascomycota*, sendo predominantemente representados pelo gênero *Diaporthe*. O segundo gênero mais frequente foi *Xylaria*. Também foi possível identificar um isolado pertencente ao gênero *Fusarium*, um isolado pertencente a família *Hypoxylaceae* e um isolado pertencente a ordem *Pleosporales*.

Tabela 4. Identificação molecular dos fungos fitopatogênicos considerados ativos frente ao ensaio herbicida.

UFMGCB ^a	Nº de isolados	Sequência tipo de referência do BLAST (Número de acesso GenBank) ^b	Cobertura (%)	Identidad e (%)	Nº de pb analisados	Espécie ou grupo taxonômico sugerido
17692	1	<i>Diaporthe</i> sp. (MG828894) ^b	99	99	414	<i>Diaporthe</i> sp. 1
17744	1	<i>Diaporthe miriciae</i> (NR147535) ^b	100	99	422	<i>Diaporthe</i> sp. 2
17747	1	<i>Diaporthe schini</i> (NR111861) ^b	100	99	404	<i>Diaporthe</i> sp. 3
17905	1	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> (NR111862) ^b	99	99	454	<i>Diaporthe</i> sp. 4
17919	1	<i>Fusarium continuum</i> (NR159818) ^b	100	94	527	<i>Fusarium</i> sp.
17767	1	<i>Daldinia bambusicola</i> (MH863245) ^b	99	88	451	<i>Hypoxylaceae</i> sp.
17769	1	<i>Xylaria bambusicola</i> (NR153200) ^b	100	95	515	<i>Xylaria</i> sp. 1
17649*, 17867	2	<i>Xylaria longissima</i> (NR147567) ^b	99	94	423	<i>Xylaria</i> sp. 2
17921	1	<i>Didymella longicolla</i> (MH863382) ^b	100	98	449	<i>Pleosporales</i> sp.
17853	1	NI	-	-	-	-
17774	1	NI	-	-	-	-
17873	1	NI	-	-	-	-
17656	1	NI	-	-	-	-
17688	1	NI	-	-	-	-

UFMGCB^a = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^b Identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região transcrita interna ITS5.8S da região do gene do rRNA. NI= não identificado. *Isolado selecionado para sequenciamento.

5.4 Fracionamento dos extratos ativos

Os extratos que foram submetidos ao ensaio para cálculo da CIM foram selecionados para fracionamento em cartucho C18. Ao final do fracionamento seis frações de cada extrato foram coletadas de acordo com os solventes utilizados, do mais polar para o menos polar: 100% água, 25% metanol, 50% metanol, 75% metanol, 100% metanol, e 100% diclorometano. As frações obtidas foram submetidas à análise de CCD, sendo conduzidas em placa de folha de alumínio revestida com uma fina camada de sílica-gel como fase estacionária, e uma mistura dos solventes, diclorometano e hexano (1:1), como fase móvel. Após a revelação com uma mistura de vanilina 1% e ácido sulfúrico 10% (1:1) as manchas observadas foram analisadas.

A placa com as respectivas frações do extrato *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649 pode ser observada na **Figura 4A**. Observou-se que o extrato bruto demonstrado em Ex apresentou muitas manchas, as quais podem ser diferentes substâncias. A fração 2 (25% MeOH) apresentou duas manchas e a fração 1 (H₂O) apresentou apenas uma mancha de cor amarronzada, que pode ser observada no extrato bruto. Nas condições de fase móvel utilizadas não puderam ser observadas nenhuma mancha a partir das frações 3 (50% MeOH) e 4 (75% MeOH), assim como não possuíram massa suficiente para a utilização no bioensaio. Quando avaliadas para a verificação da atividade herbicida, somente as frações 1 (H₂O) e 2 (25% MeOH) inibiram a germinação de todas as sementes de ambos os modelos na concentração de 500 µg/mL para *A. schoenoprasum* e 250 µg/mL para *L. sativa*, e nos poços referentes às frações 5 (100% MeOH) e 6 (100% DCM) houve a germinação das sementes (**Tabela 5**).

A placa com as respectivas frações do extrato *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 pode ser observada na **Figura 4B**. As frações 1 (H₂O), 2 (25% MeOH), 3 (50% MeOH) e Ex não puderam ser visualizadas na placa nas condições de fase móvel utilizadas. Poucas manchas foram observadas nas frações 4 (75% MeOH), 5 (100% MeOH) e 6 (100% DCM). As frações 2 (25% MeOH) e 3 (50% MeOH) não apresentaram massa suficiente para a utilização no ensaio. Quando testada para a verificação da atividade herbicida somente a fração 4 (75% MeOH) inibiu a germinação de todas as sementes de cebolinha (*A. schoenoprasum*) na concentração de 125 µg/mL, assim como o extrato bruto e o glifosato (**Tabela 5**).

A placa com as respectivas frações do extrato *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 pode ser observada na **Figura 4C**. As frações 2 (25% MeOH), 4 (75% MeOH) e 5 (100% MeOH) não possuíram massa suficiente para a avaliação no bioensaio. Quando testada, a fração 1 (H₂O)

inibiu a germinação de todas as sementes para ambos os modelos testados na concentração de 500 µg/mL para *A. schoenoprasum* e 250 µg/mL para *L. sativa*. Nos poços referentes às outras frações testadas, houve a germinação das sementes (**Tabela 5**). Todas as frações referentes aos fungos citados anteriormente foram testadas na mesma concentração que se obteve a CIM.

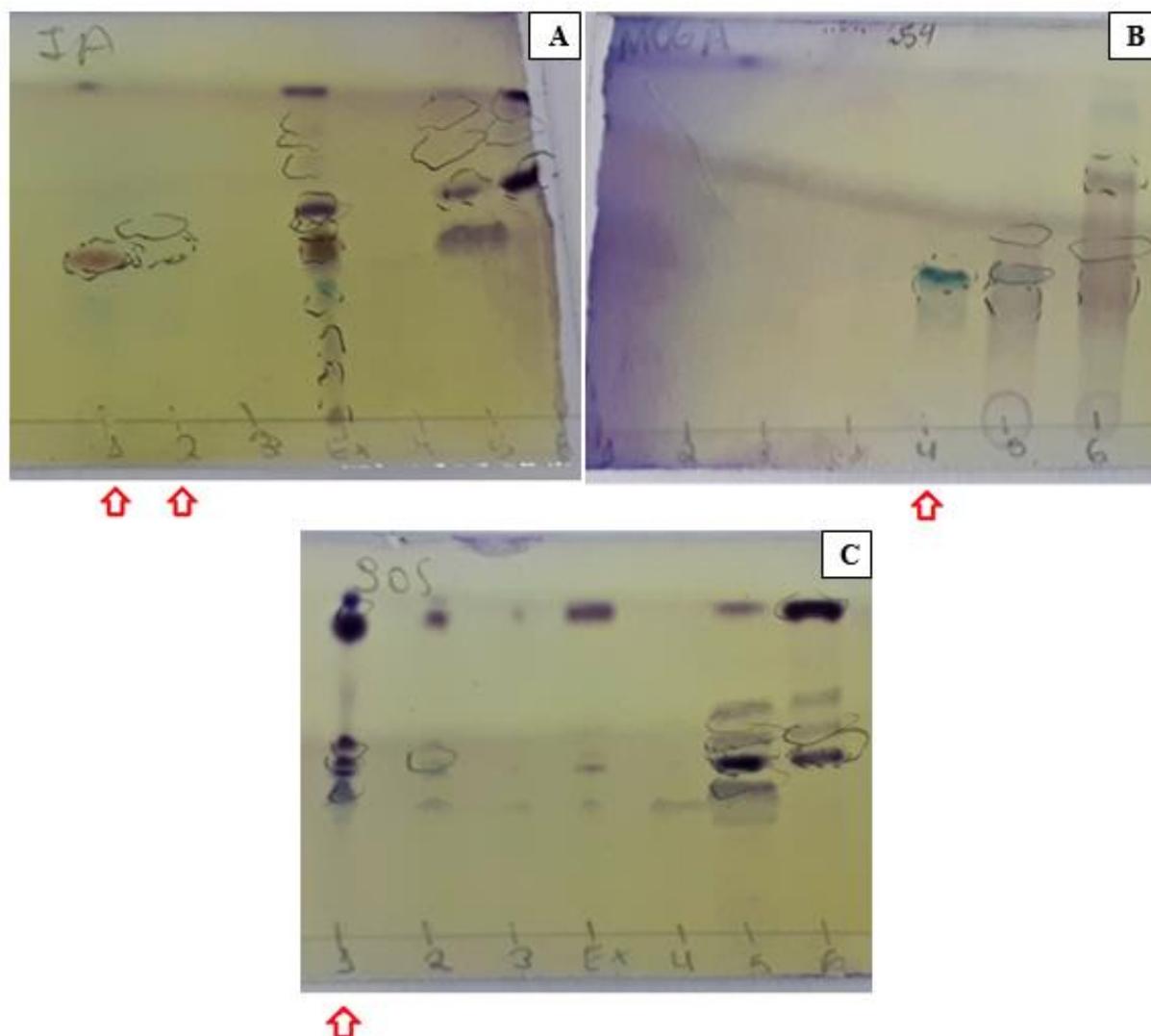


Figura 4. Placas de CCD referente aos fracionamentos dos extratos ativos, sendo as respectivas frações 1: H₂O, 2: 25% MeOH, 3: 50% MeOH, Ex: extrato bruto, 4: 75% MeOH, 5: 100% MeOH, 6: 100% DCM. (A) *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649; (B) *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744; (C) *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905.

Tabela 5. Atividade herbicida das frações obtidas a partir dos extratos ativos *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649, *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 e *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905.

Isolado	Frações	Atividade herbicida	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>
<i>Xylaria</i> sp. 2 UFMGCB17649	1: H ₂ O	5±0	5±0
	2: 25% MeOH	5±0	5±0
	5: 100% MeOH	1±1	0,5±0,5
	6: 100% DCM	1±0	1,5±0,5
	Ex: Extrato bruto	5±0	5±0
	Glifosato	5±0	5±0
<i>Diaporthe</i> sp. 2 UFMGCB17744	1: H ₂ O	-	1,5±0,5
	4: 75% MeOH	-	5±0
	5: 100% MeOH	-	0,5±0,5
	6: 100% DCM	-	1±0
	Extrato bruto	-	5±0
	Glifosato	-	5±0
<i>Diaporthe</i> sp. 4 UFMGCB17905	1: H ₂ O	5±0	5±0
	3: 50% MeOH	2,5±0,5	2,5±0,5
	6: 100% DCM	1,5±0,5	0,5±0,5
	Ex: Extrato bruto	5±0	5±0
	Glifosato	5±0	5±0

A estimativa qualitativa da fitotoxicidade foi realizada atribuindo uma escala de 0-5, onde 0 = todas as sementes germinaram/nenhum efeito e 5 = nenhuma semente germinou ± desvio padrão. Plantas alvo: *Lactuca sativa* = alface crespa, *Allium schoenoprasum* = cebolinha. A concentração testada foi a mesma obtida no CIM.

Por se tratar de um extrato bruto, nas condições utilizadas na CDD, poucas manchas foram observadas nas placas. Podemos verificar que as frações obtidas a partir dos extratos *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649 e *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 consideradas ativas apresentaram poucas manchas em relação as frações inativas no ensaio. Portanto, essas frações se destacam como protótipos para o desenvolvimento de novos herbicidas.

5.5 Análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)

As frações ativas de *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649, *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 e *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 foram submetidas à análise pela técnica de UHPLC-MS visando a identificação dos possíveis metabólitos bioativos. Entretanto, os cromatogramas gerados e analisados foram inconclusivos. Desta forma, técnicas adicionais serão realizadas a fim de caracterizar as possíveis substâncias com atividade herbicida.

6. DISCUSSÃO

6.1 Isolamento dos fungos fitopatogênicos

No presente estudo 27 plantas com sintomas de infecção foram aleatoriamente selecionadas e coletadas nas trilhas pertencentes ao PERD. A maior parte da bacia do Rio Doce está inserida no bioma Mata Atlântica, e embora apresente uma grande diversidade e endemismo de espécies de fauna e flora, esse bioma se encontra extremamente ameaçado pelas atividades antrópicas, restando apenas 15% da sua cobertura vegetal original (INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS, 2019). Depois do rompimento da barragem de Fundão na cidade de Mariana, que causou a destruição de 1.469 hectares ao longo de 77 quilômetros de cursos d'água (IBAMA, 2015), o rejeito de minério acabou devastando matas ciliares, solos, árvores, vegetação herbácea, soterrou a serapilheira e seus bancos de sementes, afetando diretamente a fauna local (DA SILVA et al., 2015). Devido a esse grande impacto é de suma importância o desenvolvimento de pesquisas na área, e com o presente estudo, foi possível fazer a preservação *ex situ* de parte da comunidade microbiana encontrada em plantas doentes do local, e explorar o seu potencial biotecnológico.

No estágio em que as plantas foram coletadas podemos considerar que os isolados de fungos obtidos são biotróficos, uma vez que as plantas hospedeiras estavam vivas, apesar dos sintomas de infecção característicos que apresentavam. Quando os fungos fitopatogênicos colonizam as plantas e roubam seus nutrientes sem ocasionar a morte das suas células são chamados de biotróficos (IDNURM & HOWLETT, 2001). Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que fungos fitopatogênicos tropicais podem ser considerados boas fontes de substâncias herbicidas, corroborando com resultados prévios. Souza e colaboradores (2017) isolaram 39 fungos fitopatogênicos de 13 espécies de ervas daninhas com sintomas de infecção coletadas no bioma brasileiro Pampa, dos estados de Rio Grande do Sul e São Paulo. Os extratos obtidos por meio de fermentação líquida produzidos a partir desses fungos tiveram sua fitotoxicidade avaliada frente à *Cucumis sativus* L. (pepino) e 28 isolados demonstraram bioatividade. Dentre estes, o fungo que apresentou a atividade herbicida mais pronunciada foi identificado como *Diaporthe* sp. No estudo de El-Said e colaboradores (2014), 48 espécies fúngicas foram obtidas de 50 fragmentos foliares de *Vicia faba* L. (fava) com sintomas de infecção. A coleta foi realizada no Egito, e resultou na identificação de 23 gêneros diferentes, sendo mais predominantes *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mycosphaerella* e *Penicillium*.

Ao compararmos o número de isolados obtidos no atual trabalho com os estudos mencionados, percebemos um número maior de isolados fitopatogênicos recuperados. Diversos fatores podem ter contribuído para essa diferença, como a área de coleta estar localizada em uma região tropical, possuindo altas temperaturas e clima úmido, o que é ideal para o desenvolvimento dos fungos, além da quantidade de fragmentos foliares e meio de cultura utilizados.

6.2 Determinação da atividade herbicida

Embora seja relevante e necessária, a busca por herbicidas derivados de produtos naturais é um tema recente, e, portanto, são poucos os estudos encontrados na literatura que demonstram o uso das fitotoxinas fúngicas com potencial para o desenvolvimento de novos herbicidas. Por outro lado, são diversos os estudos que relatam a capacidade dos fungos de produzirem substâncias com atividade antimicrobiana (LIU et al., 2013; BAKER & SATISH, 2012; CARVALHO et al., 2018), antitumoral (PONGCHAROEN et al., 2006), antioxidante (TEJESVI et al., 2008), anti-alzheimer (OLIVEIRA et al., 2011), entre outros, demonstrando que os metabólitos produzidos por esses micro-organismos possui um grande valor industrial.

Atualmente, fungos fitopatogênicos que causam doenças em plantas, se destacam como alvo na busca por herbicidas com novos mecanismos de ação (DUKE & DAYAN, 2011). Estes micro-organismos podem produzir fitotoxinas durante a interação patógeno-hospedeiro, as quais quando isoladas podem ser utilizadas frente às ervas daninhas que causam prejuízos na agricultura (VURRO et al., 2018). No presente trabalho, 15 extratos produzidos a partir dos fungos fitopatogênicos isolados foram considerados ativos na triagem para a avaliação da atividade herbicida e suas atividades confirmadas após o reteste. Dos extratos ativos, aqueles produzidos a partir dos fungos *Diapotha* sp. 4 UFMGCB17905, *Xylaria* sp. 1 UFMGCB17769 e UFMGCB17873 apresentaram atividade herbicida para ambos os modelos testados. Desta forma, podemos considerar que os extratos que inibiram a germinação das sementes de ambos os modelos, dicotiledônea e monocotiledônea, possuem um amplo espectro de ação, assim como o glifosato, um herbicida não seletivo. Essa seletividade é baseada na eficácia que as culturas de interesse possuem em metabolizar o herbicida antes que causem danos, sendo classificados como seletivos quando são tóxicos para as ervas daninhas, mas a cultura de interesse tolera o tratamento; ou não seletivos, quando afetam todos os tipos de plantas, matando as que possuem interesse agrícola e as que não são transgênicas, além das ervas daninhas, por isso, sua aplicação é feita antes ou depois

do plantio (ROMAN, 2007). Os extratos dos isolados *Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649, *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905 e *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 inibiram 100% a germinação das sementes de pelo menos um dos modelos avaliados e foram submetidos ao ensaio para cálculo da CIM.

Meepagala e colaboradores (2018) relatam o isolamento e a identificação do fungo *Diaporthe eres* obtido a partir de folhas de *Hedera helix*, coletadas em Oxford, Mississippi (EUA), as quais exibiam sinais de necrose. Duas substâncias isoladas a partir do fracionamento do extrato fúngico, identificadas como de 3,4-dihidro-8-hidroxi-3,5-dimetilisocumarina (1) e 2-(4-hydroxyphenyl)-ethanol (2), foram avaliadas frente à germinação e o crescimento das sementes de *Lactuca sativa* (dicotiledônea) e *Agrostis stolonifera* (monocotiledônea). Uma escala de 0 (todas as sementes germinaram) a 5 (completa inibição das sementes) foi utilizada para avaliar o experimento, sendo que uma maior fitotoxicidade foi observada frente o modelo de monocotiledônea para ambos os compostos testados. Quando testados frente ao modelo de *L. sativa*, a substância (1) inibiu a germinação de 3 sementes e o composto (2) inibiu a germinação de 1 semente. Quando testados frente ao modelo de *A. stolonifera*, a substância (1) inibiu a germinação de 4 sementes e a (2) inibiu a germinação de todas as sementes (MEEPAGALA et al., 2018). Florindo (2019) obteve seis isolados endofíticos identificados como pertencentes à família *Xylariaceae* isolada da planta *Piper* sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. Quando testados no ensaio herbicida, cinco deles apresentaram atividade frente o modelo de dicotiledôneas (*Lactuca sativa*) e apenas um para o modelo de monocotiledôneas (*Allium schoenoprasum*), demonstrando ser um gênero com potencial herbicida a ser explorado.

6.3 Identificação dos fungos bioativos

Os fungos identificados no presente trabalho, pertencentes aos gêneros *Diaporthe*, *Fusarium* e *Xylaria*, família *Hypoxylaceae* e ordem *Pleosporales*, foram considerados produtores de substâncias com atividade fitotóxica pois foram capazes de inibir a germinação das sementes estudadas. Fungos pertencentes ao gênero *Diaporthe* estão distribuídos mundialmente e são encontrados em uma ampla variedade de famílias de plantas. Possui aproximadamente 213 espécies descritas, as quais há representantes endófitas e sapróbias (GARCIA-REYNE et al., 2011; UDAYANGA et al., 2014; GOMES et al., 2013). Estudos já confirmaram que espécies desse gênero estão associadas a doenças que acometem uma ampla

variedade de plantações agrícolas que são economicamente importantes, causando prejuízos para o agronegócio (MAHADEVAKUMAR & JANARDHANA, 2016; GUARNACCIA et al., 2018; ZAW et al., 2020). Dentre os sintomas de infecção nas plantas, destacam-se: manchas foliares, decomposição de sementes, apodrecimento das raízes e dos frutos e cancos no caule (MARIN-FELIX et al., 2019). Diversos trabalhos relatam que fungos do gênero *Diaporthe* são responsáveis por afetar as culturas de soja em várias partes do mundo, provocando doenças como cranco da haste e podridão de sementes (COSTAMILAN et al., 2008; BENAVIDEZ et al., 2010; MENGISTU et al., 2014; PETROVIĆ et al., 2016).

O gênero fúngico *Fusarium* possui distribuição cosmopolita e compreende aproximadamente 300 espécies filogenicamente distintas, podendo ser encontradas no solo ou atuando como parasitas, endofíticos e patógenos vegetais que comprometem culturas agrícolas (AOKI et al., 2014). Acometem principalmente plantações de grãos, sendo os principais causadores da podridão do colmo e grãos do milho (MUNKVOLD, 2003). Pode resultar na contaminação desses alimentos por micotoxinas, causando problemas de saúde em pessoas e animais que os ingerem (MILLER, 2008). No geral, doenças causadas por espécies de *Fusarium* são chamadas de Fusariose (COSTA et al., 2003; VENTURA et al., 2009).

De acordo com Webster e Weber (2007), *Xylaria* compreende aproximadamente 100 espécies descritas, saprófitas e endofíticas, sendo comumente encontradas em plantas de clima tropical. Poucos relatos são encontrados na literatura demonstrando fungos pertencentes a esse gênero atuando como fitopatógenos. *Xylaria feejeensis* foi reportada por causar a doença de podridão seca em sementes de *Raphia hookeri* após um período de armazenamento. Quando frutos saudáveis foram inoculados com diferentes gêneros fúngicos, *X. feejeensis* foi o único capaz de reproduzir os sintomas da doença (ESIEGBUYA et al., 2013).

Algumas espécies fúngicas pertencentes a ordem *Pleosporales* (SANTOS et al., 2006; IMTIAZ et al., 2011) são descritas como fitopatogênicas, já espécies pertencentes a família *Hypoxylaceae* são relatadas como endofíticas produtoras de metabólitos secundários bioativos (LIARZI et al., 2016; HU et al., 2019). Apesar dos fungos fitopatogênicos causarem prejuízos na agricultura, o estudo de fitotoxinas produzidas por este grupo de micro-organismos se destacam como potencial para a descoberta de novos mecanismos de ação de herbicidas, que sejam eficazes frente às ervas daninhas que afetam as plantações.

6.4 Fracionamento dos extratos herbicidas

Metabólitos secundários são substâncias naturais de baixo peso molecular derivados de organismos vivos que possuem um alto potencial biotecnológico (BRAKHAGE, 2013). Os fungos produzem uma ampla gama desses metabólitos, e os extratos brutos derivados desses micro-organismos possuem uma variedade de substâncias (ZHONG, 2009). Substâncias derivadas de produtos naturais quando comparadas aos agrotóxicos convencionais são muito mais seguras para serem utilizadas na agricultura. Isso se deve ao fato de possuírem alta especificidade, toxicidade baixa ou ausente frente aos organismos não-alvo, e serem totalmente compatíveis com o meio ambiente, pois possuem a biodegradabilidade quase completa, permanecendo no meio apenas o tempo suficiente para atuar no alvo (SCHRADER et al., 2010). Além disso, os fungos têm a capacidade de produzirem inúmeras substâncias com potencial biotecnológico, permitindo um amplo campo de pesquisa. Até o momento, aproximadamente 400 fitotoxinas derivadas de micro-organismos foram isoladas e identificadas (STRANGE, 2007; CIMMINO et al., 2015).

A produção de um bioherbicida para o controle de ervas daninhas requer uma série de etapas até chegar na sua formulação final. Nesse estudo, três fungos com grande potencial, os quais apresentaram atividade fitotóxica em pequenas concentrações (*Xylaria* sp. 2 UFMGCB17649, *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB17744 e *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB17905), foram selecionados e seus extratos brutos submetidos a um fracionamento biomonitorado, com o objetivo de identificar as substâncias responsáveis pela atividade herbicida. Nas condições de fase móvel utilizadas foi possível observar que as possíveis substâncias responsáveis pela atividade foram separadas, pois quando submetidas ao ensaio herbicida, apenas algumas frações foram ativas. Dessa forma, os próximos passos serão identificar as fitotoxinas responsáveis pela atividade através de técnicas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), e consulta nos bancos de dados *SciFinder* e *DataAnalysis*.

Espécies de *Xylaria* são capazes de produzir metabólitos secundários biologicamente ativos com uma ampla diversidade de compostos químicos como terpenóides, citocalasinas, alcalóides, policetídeos, compostos aromáticos e compostos orgânicos voláteis incluindo ésteres e álcoois (SONG et al., 2014; SÁNCHEZ-ORTIZ et al., 2016). A partir do fungo endofítico *Xylaria* sp., obtido da planta *Toona sinensis* (China), foi produzido o extrato utilizando o solvente acetato de etila, e esse extrato bruto passou por um fracionamento em coluna sílica gel, obtendo cinco frações. Quando sua fitotoxicidade foi avaliada frente aos

modelos de dicotiledôneas *L. sativa* e *Raphanus sativus* L., observou-se que apenas a fração 5, caracterizada como citocalasina E, apresentou o maior potencial para inibição das sementes de ambos os modelos, com uma fitotoxicidade maior do que o glifosato, utilizado como controle positivo (ZHANG et al., 2014).

Do fungo *Diaporthe kongii*, associado à doença de cancro da haste em girassóis na Austrália, foi isolado a substância nomeada *kongiiazadione* (3-substitua-5-diazetilciclopentendiona) que apresentou fitotoxicidade em 15 espécies diferentes de ervas daninhas, causando lesões necróticas nas folhas (EVIDENTE et al., 2015). Doenças que acometem tronco de videira estão associadas com uma infinidade de fungos fitopatogênicos, incluindo espécies de *Diaporthe* sp. O fungo *D. eres* isolado de folhas de videira coletadas na Itália, foram capazes de produzir cinco metabólitos fitotóxicos, identificados como 4-hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzóico, nectriapirona e p-cresol e tirosol. Todas as substâncias, exceto p-cresol, já foram reportadas como metabólitos produzidos por fungos fitopatogênicos (REVEGLIA et al., 2019). Esses trabalhos corroboram com a ideia de que fungos pertencentes aos gêneros *Diaporthe* sp. e *Xylaria* sp. são produtores de compostos com atividade fitotóxica com potencial herbicida a serem explorados.

7. CONCLUSÕES

O Brasil possui um importante papel no cenário agro-econômico atual e é, mundialmente, um dos principais produtores e exportadores de alimentos. Por outro lado, é um dos países que mais consome agrotóxicos no mundo, sendo isso um entrave para o seu desenvolvimento sustentável. Com o presente trabalho, foi possível selecionar fungos com um forte potencial herbicida, concluindo que:

- Os fungos fitopatogênicos isolados de plantas presentes em ecossistemas tropicais naturais que tiveram seus extratos ativos no ensaio da avaliação da atividade herbicida podem ser considerados candidatos a estudos de isolamento e caracterização de fitotoxinas. Estas por sua vez poderiam ser utilizadas como fonte para a descoberta de novos mecanismos de ação para a formulação de um herbicida natural;
- As técnicas de biologia molecular utilizadas propiciaram a identificação de alguns isolados ativos em nível de ordem, família ou gênero. Técnicas adicionais deverão ser adotadas a fim de se obter suas identificações em nível de espécie.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram a importância de se explorar os metabólitos secundários produzidos pelos fungos, em especial os fitopatogênicos, pois são fontes de substâncias com um grande valor biotecnológico e industrial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGAS, F. S.; ADEGAS, F. S.; GAZZIERO, D. L. P.; VARGAS, L.; KARAM, D.; DA SILVA, A. F.; AGOSTINETTO, D. (2017). Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil. In: Circular técnica 132 (pp. 1-11). Londrina: Embrapa Soja.
- ANDOLFI, A., CIMMINO, A., VURRO, M., BERESTETSKIY, A., TROISE, C., ZONNO, M. C., MOTTA, A., & EVIDENTE, A. (2012). Agropyrenol and agropyrenal, phytotoxins from *Ascochyta agropyrina* var. *nana*, a fungal pathogen of *Elitrigia repens*. *Phytochemistry*, 79:102-108.
- ANVISA. (2019). NOTA TÉCNICA Nº 23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+t%C3%A9cnica+23+de+2018+-+Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- AOKI, T., O'DONNELL, K., & GEISER, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *J Gen Plant Pathol*, 80:189-201.
- BAI, S. H., & OGBOURNE, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ Sci Pollut R*, 23:18988-19001.
- BAKER, S., & SATISH, S. (2012). Endophytes: natural warehouse of bioactive compounds. *Drug Invent Today*, 4:548-553.
- BECERRIL, J. M., DUKE, S. O., & LYDON, J. (1989). Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry*, 28:695-699.
- BENAVIDEZ, R., PIOLI, R. N., & MORANDI, E. N. (2010). Response of the edamame edible soybean germplasm to *Diaporthe phaseolorum*, causal agent of soybean stem canker, in Argentina. *Trop Plant Pathol*, 35:048-051.
- BENBROOK, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*, 28:3.
- BRAKHAGE, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Ver Microbiol*, 11:21-32.
- CALDAS, E. D. (2016). Pesticide poisoning in Brazil reference module in earth systems and environmental sciences. *Enc Environ Health*, 419-427.

- CANTRELL, C. L., DAYAN, F. E., & DUKE, S. O. (2012). Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod*, 75:1231-1242.
- CARVALHO, C. D., FERREIRA-D'SILVA, A., WEDGE, D. E., CANTRELL, C. L., & ROSA, L. H. (2018). Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miriciae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal plants. *Can J Microbiol*, 64:835-843.
- CASTELLANI, A. (1967). Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in sterile distilled water for the researches. *J Trop Med Hyg*, 70:181-184.
- CIMMINO, A., MASI, M., EVIDENTE, M., SUPERCHI, S., & EVIDENTE, A. (2015). Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. *Nat Prod Rep*, 32:1629-1653.
- COSTA, R. S., MÔRO, F. V., MÔRO, J. R., SILVA, H. P. D., & PANIZZI, R. D. C. (2003). Relação entre características morfológicas da cariopse e fusariose em milho. *Pesq Agropec Bras*, 38:27-33.
- COSTAMILAN, L. M., YORINORI, J. T., ALMEIDA, Á. M., SEIXAS, C. D., BINNECK, E., ARAÚJO, M. R., & CARBONARI, J. A. (2008). First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* infecting soybean plants in Brazil. *Trop Plant Pathol*, 33:381-385.
- CREMONESE, C., PICCOLI, C., PASQUALOTTO, F., CLAPAUCH, R., KOIFMAN, R. J., KOIFMAN, S., & FREIRE, C. (2017). Occupational exposure to pesticides, reproductive hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. *Reprod Toxicol*, 67:174-185.
- SILVA, D. L., FERREIRA, M. C., & SCOTTI, M. R. (2015). O maior desastre ambiental brasileiro: De Mariana (MG) a Regência (ES). *Arq. Mus. Hist. Nat. Jardim Bot.* 157:136–158.
- DAYAN, F. E., & DUKE, S. O. (2014). Natural compounds as next-generation herbicides. *Plant Physiol*, 166:1090-1105.
- DAYAN, F. E. (2019). Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants*, 8:341.
- DUKE, S. O., & DAYAN, F. E. (2011). Modes of action of microbially-produced phytotoxins. *Toxins*, 3:1038-1064.
- DUKE, S. O. (2012). Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years?. *Pest Manag Sci*, 68:505-512.

- DUKE, S. O., & DAYAN, F. E. (2015). Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins. *Amer Chem Soc*, 1204:79-97.
- DUKE, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest Manag Sci*, 74:1027-1034.
- EL-SAID, A. H. M., SALEEM, A., MAGHRABY, T. A., & HUSSEIN, M. A. (2014). Cellulase activity of some phytopathogenic fungi isolated from diseased leaves of broad bean. *Arch Phytopathol Plant Protect*, 47:2078-2094.
- EMBRAPA. (2016). Produção Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/macrologistica/producao-agropecuaria>>. Acesso em: 28 dez. 2019.
- ESIEGBUYA, D. O., OKUNGBOWA, F. I., ORUADE-DIMARO, E. A., & AIREDE, C. E. (2013). First report of postharvest dry rot of *Raphia hookeri* fruits caused by *Xylaria feejeensis*. *J Plant Pathol*, 95:449.
- EVIDENTE, M., BOARI, A., VERGURA, S., CIMMINO, A., VURRO, M., ASH, G., SUPERCHI, S., & EVIDENTE, A. (2015). Structure and Absolute Configuration of Kongiidiazadione, a New Phytotoxic 3-Substituted-5-Diazenylcyclopentendione Produced by *Diaporthe Kongii*. *Chirality*, 27:557-562.
- FAO. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=BRA>>. Acesso em: 28 dez. 2019.
- FLORINDO, R. H. S. Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Piper* sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. 113 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.
- FRANCL, L. J. (2001). The disease triangle: a plant pathological paradigm revisited. *Plant Health Instr*, 10.
- GARCIA-REYNE, A., LÓPEZ-MEDRANO, F., MORALES, J. M., GARCIA ESTEBAN, C., MARTÍN, I., ERAÑA, I., MEJE, Y., LALUEZA, A., IZQUIERDO-ALASTRUEY, A., TUDELA-RODRÍGUEZ, J. L., & AGUADO, J. M. (2011). Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transpl Infect Dis*, 13:204-207.
- GIANESSI, L. P. (2008). Economic impacts of glyphosate-resistant crops. *Pest Manag Sci*, 64:346-352.

- GODINHO, V. M., FURBINO, L. E., SANTIAGO, I. F., PELLIZZARI, F. M., YOKOYA, N. S., PUPO, D., ALVES, T. M. A., JUNIOR, P. A. S., ROMANHA, A. J., ZANI, C. L., CANTRELL, C. L., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J*, 7:1434-1451.
- GOMES, E. C., GODINHO, V. M., SILVA, D. A., DE PAULA, M. T., VITORELI, G. A., ZANI, C. L., ALVES, T. M. A., JUNIOR, P. A. S., MURTA, S. M. F., BARBOSA, E. C., OLIVEIRA, J. G., OLIVEIRA, F. S., CARVALHO, C. R., FERREIRA, M. C., ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2018). Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*, 22:381-393.
- GOMES, R. R., GLIENKE, C., VIDEIRA, S. I. R., LOMBARD, L., GROENEWALD, J. Z., & CROUS, P. W. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31:1.
- GUARNACCIA, V., GROENEWALD, J. Z., WOODHALL, J., ARMENGOL, J., CINELLI, T., EICHMEIER, A., EZRA, D., FONTAINE, F., GRAMAJE, D., GUTIERREZ-AGUIRREGABIRIA, A., KALITERNA, J., KISS, L., LARIGNON, P., LUQUE, J., MUGNAI, L., NAOR, V., RAPOSO, R., SÁNDOR, E., VÁCZY, K. Z., & CROUS, P. W. (2018). *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe. *Persoonia*, 40:135.
- HANKE, I., WITTMER, I., BISCHOFBERGER, S., STAMM, C., & SINGER, H. (2010). Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere*, 81:422-429.
- HAUSMAN, N. E., SINGH, S., TRANEL, P. J., RIECHERS, D. E., KAUNDUN, S. S., POLGE, N. D., THOMAS, D. A., & HAGER, A. G. (2011). Resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Illinois, United States. *Pest Manag Sci*, 67:258-261.
- HEAP, I., & DUKE, S. O. (2018). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag Sci*, 74:1040-1049.
- HEAP, I. (2019). The International Herbicide-Resistant Weed Database. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 10 nov. 2019.
- HELANDER, M., SALONIEMI, I., & SAIKKONEN, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends Plant Sci*, 17:569-574.

- HORTH, H., BLACKMORE, K. (2009). Survey of glyphosate and AMPA in groundwaters and surface waters in Europe. Report by WRc plc, Swindon, Wiltshire, United Kingdom No: UC8073 2.
- HU, M., YANG, X. Q., ZHOU, Q. Y., LI, S. Q., WANG, B. Y., RUAN, B. H., YANG, Y. B., ZHANG, Z. X., ZHOU, H., & DING, Z. T. (2019). Benzopyran derivatives from endophytic *Daldinia eschscholzii* JC-15 in *Dendrobium chrysotoxum* and their bioactivities. *Nat Prod Res*, 33:1431-1435.
- IBAMA. (2015). Laudo Técnico Preliminar – Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Diretoria de Proteção Ambiental - DIPRO & Coordenação Geral de Emergências Ambientais – CGEMA. p. 38.
- IBGE. (2019). Agricultura, pecuária e outros. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>>. Acesso em: 28 dez. 2019.
- IDNURM, A., & HOWLETT, B. J. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol*, 2:241-255.
- IKEDA, K., PARK, P., & NAKAYASHIKI, H. (2019). Cell biology in phytopathogenic fungi during host infection: commonalities and differences. *J Gen Plant Pathol*, 85:163-173.
- IMTIAZ, M., ABANG, M. M., MALHOTRA, R. S., AHMED, S., BAYAA, B., UDUPA, S. M., & BAUM, M. (2011). Pathotype IV, a new and highly virulent pathotype of *Didymella rabiei*, causing Ascochyta blight in chickpea in Syria. *Plant Dis*, 95:1192-1192.
- INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS. (2019). Parque Estadual do Rio Doce. Disponível em: <<http://www.ief.mg.gov.br/component/content/195?task=view>>. Acesso em: 29 de Set. 2019.
- JAMES, C. (2008). Global status of commercialized biotech/GM crops: The first thirteen years, 1996 to 2008. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/39/executivesummary/default.html>>. Acesso em: 05 de fev. 2020.
- JASKULSKI, D., & JASKULSKA, I. (2011). Effect of Glyphosate used in desiccation of white mustard (*Sinapis alba* L.) on the value of the seed material. *Acta Sci Pol., Agricultura*, 10:51.

- KARAM, D.; DA SILVA, A. F.; GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F. S.; VARGAS, L. (2018). Situação atual da resistência de plantas daninhas a herbicidas nos sistemas agrícolas. Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE).
- KORRES, N. E.; BURGOS, N. R.; DUKE, S. O. (2018). Weed Control: Sustainability, Hazards, and Risks in Cropping Systems Worldwide. CRC Press.
- LERMEN, J., BERNIERI, T., RODRIGUES, I. S., SUYENAGA, E. S., & ARDENGHI, P. G. (2018). Pesticide exposure and health conditions among orange growers in Southern Brazil. *J Environ Sci Heal B*, 53:215-221.
- LIARZI, O., BAR, E., LEWINSOHN, E., & EZRA, D. (2016). Use of the endophytic fungus *Daldinia cf. concentrica* and its volatiles as bio-control agents. *PLoS One*, 11: e0168242.
- LIECKFELDT, E., MEYER, W., & BÖRNER, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J Basic Microbiol*, 33:413-425.
- LIU, S., LIU, X., GUO, L., CHE, Y., & LIU, L. (2013). 2H-Pyran-2-one and 2H-Furan-2-one Derivatives from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis fici*. *Chem Biodivers*, 10:2007-2013.
- LYDON, J., & DUKE, S. O. (1988). Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *J Agric Food Chem*, 36:813-818.
- MAHADEVAKUMAR, S., & JANARDHANA, G. R. (2016). Leaf blight and fruit rot disease of brinjal caused by *Diaporthe vexans* (*Phomopsis vexans*) in six agro-ecological regions of South West India. *Pl Pathol Quarant*, 6:5-12.
- MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. (2008). Herbicidas: mecanismos de ação e uso. 1st edn. Embrapa Cerrado, Planaltina.
- MARIN-FELIX, Y., HERNÁNDEZ-RESTREPO, M., ITURRIETA-GONZÁLEZ, I., GARCÍA, D., GENÉ, J., GROENEWALD, J. Z., CAI, L., CHEN, Q., QUAEDVLIEG, W., SCHUMACHER, R. K., TAYLOR, P. W. J., AMBERS, C., BONTHOND, G., EDWARDS, J., KRUEGER-HADFIELD, S. A., LUANGSA-ARD, J. J., MORTON, L., MOSLEMI, A., SANDOVAL-DENIS, M., TAN, Y. P., THANGAVEL, R., VAGHEFI, N., CHEEWANGKOON, R., & CROUS, P. W. (2019). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. *Stud Mycol*, 94:1-124.
- MATTHEY, H., FABIOSA, J., FULLER, F. (2004). Brazil: the future of modern agriculture. (p. 25). MATRIC Briefing Paper 04-MBP 6, Ames, IA.

- MCDUGALL, P. (2016). Agrochemical Research and Development: The Cost of New Product Discovery, Development and Registration. (p. 43). Pathhead: Midlothian, UK.
- MEEPAGALA, K. M., JOHNSON, R. D., & DUKE, S. O. (2016). Curvularin and Dehydrocurvularin as Phytotoxic Constituents from *Curvularia intermedia* Infecting *Pandanus amaryllifolius*. *J Agric Chem Environ*, 5:12-22.
- MEEPAGALA, K. M., BRISCOE, W. E., TECHEN, N., JOHNSON, R. D., CLAUSEN, B. M., & DUKE, S. O. (2018). Isolation of a phytotoxic isocoumarin from *Diaporthe eres*-infected *Hedera helix* (English ivy) and synthesis of its phytotoxic analogs. *Pest Manag Sci*, 74:37-45.
- MENGISTU, A., CASTLEBURY, L. A., MOREL, W., RAY, J. D., & SMITH, J. R. (2014). Pathogenicity of *Diaporthe* spp. isolates recovered from soybean (*Glycine max*) seeds in Paraguay. *Can J Plant Pathol*, 36:470-474.
- MILLER, J. D. (2008). Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Addit Contam*, 25:219-230.
- MÖLLER, M., & STUKENBROCK, E. H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 15:756.
- MONSANTO. (2014). Background - Glyphosate and Water Quality. Disponível em: <<https://monsanto.com/app/uploads/2017/06/glyphosate-and-water-quality.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- MUNKVOLD, G. P. (2003). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur J Plant Pathol*, 109:705-713.
- OLIVEIRA, C. M., REGASINI, L. O., SILVA, G. H., PFENNING, L. H., YOUNG, M. C., BERLINCK, R. G., BOLZANI, V. S., & ARAUJO, A. R. (2011). Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. *Phytochem Lett*, 4:93-96.
- OLIVEIRA, F. A., REIS, L. P., SOTO-BLANCO, B., & MELO, M. M. (2015). Pesticides residues in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the São Francisco River, Brazil. *J Environ Sci Heal B*, 50:398-405.
- PEREIRA, P. A. A., MARTHA, G. B., SANTANA, C. A., & ALVES, E. (2012). The development of Brazilian agriculture: future technological challenges and opportunities. *Agric Food Secur* 1:1-12.
- PETERS, B., & STREK, H. J. (2018). Herbicide discovery in light of rapidly spreading resistance and ever-increasing regulatory hurdles. *Pest Manag Sci*, 74:2211-2215.

- PETROVIĆ, K., RICCIONI, L., VIDIĆ, M., ĐORĐEVIĆ, V., BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S., ĐUKIĆ, V., & MILADINOV, Z. (2016). First report of *Diaporthe novem*, *D. foeniculina*, and *D. rudis* associated with soybean seed decay in Serbia. *Plant Dis*, 100:2324-2324.
- PINGALI, P. (2007). Agricultural mechanization: adoption patterns and economic impact. *Handb Agric Econ*, 3:2779-2805.
- PONGCHAROEN, W., RUKACHAISIRIKUL, V., PHONGPAICHIT, S., RUNGJINDAMAI, N., & SAKAYAROJ, J. (2006). Pimarane Diterpene and Cytochalasin Derivatives from the Endophytic Fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. *J Nat Prod*, 69:856-858.
- REDDY, K. N., DING, W., ZABLOTOWICZ, R. M., THOMSON, S. J., HUANG, Y., & KRUTZ, L. J. (2010). Biological responses to glyphosate drift from aerial application in non-glyphosate-resistant corn. *Pest Manag Sci*, 66:1148-1154.
- REVEGLIA, P., PACETTI, A., MASI, M., CIMMINO, A., CARELLA, G., MARCHI, G., MUGNAI, L., & EVIDENTE, A. (2019). Phytotoxic metabolites produced by *Diaporthe eres* involved in cane blight of grapevine in Italy. *Nat Prod Res*, 1-9.
- ROMAN, E. S. (2007). Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação. (p. 160). Passo Fundo: Berthier.
- ROSA, L. H., VAZ, A. B., CALIGIORNE, R. B., CAMPOLINA, S., & ROSA, C. A. (2009). Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biol*, 32:161-167.
- ROSA, L. H., QUEIROZ, S. C., MORAES, R. M., WANG, X., TECHEN, N., PAN, Z., CANTRELL, C. L., & WEDGE, D. E. (2013). *Coniochaeta ligniaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smallanthus sonchifolius* (*Asteraceae*). *Symbiosis*, 60:133-142.
- RUTKOSKI, C. F., MACAGNAN, N., KOLCENTI, C., VANZETTO, G. V., STURZA, P. F., HARTMANN, P. A., & HARTMANN, M. T. (2018). Lethal and sublethal effects of the herbicide atrazine in the early stages of development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Arch Environ Contam Toxicol*, 74:587-593.
- SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L., SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E., DUARTE, G., LAPPE-OLIVERAS, P., & MACÍAS-RUBALCAVA, M. L. (2016). Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the

- endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB 3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *J Appl Microbiol*, 120:1313-1325.
- SANTOS, G. R., CAFÉ-FILHO, A. C., & REIS, A. (2006). Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. *Fitopatol Bras*, 31:476-482.
- SCHEFFER, R. P. 1983. Toxins as chemical determinants of plant disease. In: *Toxins and Plant Pathogenesis* (pp. 1-40). Academic Press, New York.
- SCHRADER, K. K., ANDOLFI, A., CANTRELL, C. L., CIMMINO, A., DUKE, S. O., OSBRINK, W., WEDGE, D. A., & EVIDENTE, A. (2010). A survey of phytotoxic microbial and plant metabolites as potential natural products for pest management. *Chem Biodivers*, 7:2261-2280.
- SCHREINEMACHERS, P., & TIPRAQSA, P. (2012). Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food policy*, 37:616-626.
- SINGH, A. K., & PANDEY, A. K. (2019). Fungal metabolites as a natural source of herbicide: A novel approach of weed management. *J Appl Nat Sci*, 11:158-163.
- SONG, F., WU, S. H., ZHAI, Y. Z., XUAN, Q. C., & WANG, T. (2014). Secondary metabolites from the genus *Xylaria* and their bioactivities. *Chem Biodivers*, 11:673-694.
- SOUZA, A. R. C. D., BALDONI, D. B., LIMA, J., PORTO, V., MARCUZ, C., MACHADO, C., FERRAZ, R. C., KUHN, R. C., JACQUES, R. J. S., GUEDES, J. V. C., & MAZUTTI, M. A. (2017). Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. *Braz J Microbiol*, 48:101-108.
- STRANGE, R. N. (2007). Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Nat Prod Rep*, 24:127-144.
- SVIRIDOV, A. V., SHUSHKOVA, T. V., ERMAKOVA, I. T., IVANOVA, E. V., EPIKTETOV, D. O., & LEONTIEVSKY, A. A. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides. *Appl Biochem Microbiol*, 51:188-195.
- TEJESVI, M. V., KINI, K. R., PRAKASH, H. S., SUBBIAH, V., & SHETTY, H. S. (2008). Antioxidant, antihypertensive, and antibacterial properties of endophytic *Pestalotiopsis* species from medicinal plants. *Can J Microbiol*, 54:769-780.
- UDAYANGA, D., CASTLEBURY, L. A., ROSSMAN, A. Y., CHUKEATIROTE, E., & HYDE, K. D. (2014). Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Divers*, 67:203-229.

- VAREJÃO, E. V., DEMUNER, A. J., BARBOSA, L. C., & BARRETO, R. W. (2013). The search for new natural herbicides—Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Prot*, 48:41-50.
- VENTURA, J. A., COSTA, H., & CAETANO, L. C. S. (2009). Abacaxi 'vitória': uma cultivar resistente à fusariose. *Rev Bras Frutic*, 31:I-II.
- VIGUEIRA, C. C., OLSEN, K. M., & CAICEDO, A. L. (2013). The red queen in the corn: agricultural weeds as models of rapid adaptive evolution. *Heredity*, 110:303-311.
- VILLAVERDE, J. J., SANDÍN-ESPAÑA, P., SEVILLA-MORÁN, B., LÓPEZ-GOTI, C., & ALONSO-PRADOS, J. L. (2016). Biopesticides from natural products: Current development, legislative framework, and future trends. *BioResources*, 11:5618-5640.
- VURRO, M., BOARI, A., CASELLA, F., & ZONNO, M. C. (2018). Fungal phytotoxins in sustainable weed management. *Curr Med Chem*, 25:268-286.
- WAGNER, H.; BLADT, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- WEBSTER, J., WEBER, R.W.S. (2007). *Introduction to fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, UK.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. J. W. T., & TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18:315-322.
- ZAW, M., AYE, S. S., & MATSUMOTO, M. (2020). *Colletotrichum* and *Diaporthe* species associated with soybean stem diseases in Myanmar. *J Gen Plant Pathol*, 86:114-123.
- ZHANG, Q., XIAO, J., SUN, Q. Q., QIN, J. C., PESCIPELLI, G., & GAO, J. M. (2014). Characterization of cytochalasins from the endophytic *Xylaria* sp. and their biological functions. *J Agr Food Chem*, 62:10962-10969.
- ZHONG, J. J., & XIAO, J. H. (2009). Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. In *Biotechnology in China I* (pp. 79-150). Springer, Berlin, Heidelberg.

