
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE FUNGOS DA ANTÁRTICA NO
COMBATE A BACTERIOSES DA MANDIOCA, TOMATE E PIMENTÃO CAUSADAS
POR *Xanthomonas* ssp.**

MARIANA GABRIELA FONSECA

**Dissertação apresentada ao instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Microbiologia Aplicada).**

**Rio Claro
2018**

MARIANA GABRIELA FONSECA

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE FUNGOS DA ANTÁRTICA NO
COMBATE A BACTERIOSES DA MANDIOCA, TOMATE E PIMENTÃO CAUSADAS
POR *Xanthomonas* ssp.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Daiane Cristine Sass

**Rio Claro
2018**

620.8 Fonseca, Mariana Gabriela
F676b Bioatividade de extratos de fungos da Antártica no combate a bacterioses da mandioca, tomate e pimentão causadas por *Xanthomonas* ssp. / Mariana Gabriela Fonseca. - Rio Claro, 2018
78 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Daiane Cristina Sass

1. Biotecnologia. 2. *Xanthomonas*. 3. Fungos. 4. Metabólitos secundários. 5. Antártica. 6. Bioatividade. I. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE FUNGOS DA ANTÁRTICA NO COMBATE A BACTERIOSES DA MANDIOCA, TOMATE E PIMENTÃO CAUSADAS POR *Xanthomonas* ssp.

AUTORA: MARIANA GABRIELA FONSECA

ORIENTADORA: DAIANE CRISTINA SASS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: MICROBIOLOGIA APLICADA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dra. DAIANE CRISTINA SASS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / UNESP / Câmpus de Rio Claro

Prof. Dra. TÂNIA PETTA
Departamento de Bioquímica e Imunologia / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 20 de julho de 2018

DEDICATÓRIA

Para minha amada mãe, que nunca deixou de acreditar em mim, sempre me apoiando e inspirando com sua inteligência e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, à minha mãe, Helena, por acreditar em mim e me inspirar todos os dias em busca de meus sonhos.

A todos os professores que passaram em minha vida e contribuíram, como tijolos em uma parede, para a construção de tudo o que conquistei e aprendi.

Ao meu namorado, Araham, pelo companheirismo, amor, paciência e dedicação.

E, por fim, a mim mesma, pela força, pela garra e pela determinação.

*A resposta certa, não importa nada: o essencial é
que as perguntas estejam certas.*

Mario Quintana

*Os que questionam são sempre os mais perigosos.
Responder não é perigoso. Uma única pergunta pode ser
mais explosiva do que mil respostas.*

Jostein Gaarder

*Podemos facilmente perdoar uma criança que tem
medo do escuro; a real tragédia da vida é quando os
homens têm medo da luz.*

Platão

O pouco que sei devo-o à minha ignorância.

Sacha Guitry

RESUMO

Ainda que consideráveis avanços tecnológicos no setor agrícola tenham proporcionado melhorias no bem-estar humano, milhares de pessoas ainda enfrentam miséria e fome ao redor do mundo. O progresso alcançado no último século, com a Revolução Verde, apesar de ter impulsionado a produção global de alimentos, também trouxe consequências catastróficas para o ambiente natural. Além disso, a população mundial continua a crescer exponencialmente, em especial em regiões emergentes como nos continentes africano e asiático. Todos esses fatores, somados aos inúmeros limitantes das produções agrícolas, representam uma grande ameaça à segurança alimentar do planeta, além de trazer prejuízos econômicos exorbitantes. Dentre os limitantes agrícolas, as fitopatologias causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* respondem por perdas de produção que podem chegar a 100%, quando em situação epidêmica. As produções de tomate, pimentão e mandioca podem ser reduzidas gravemente quando acometidas por *Xanthomonas euvesicatoria*, causadora da mancha bacteriana em pimentão e tomateiros, e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, causadora da bacteriose da mandioca. O combate atual para estas doenças baseia-se no uso de compostos cúpricos, notadamente danosos à saúde humana e ambiental, mas há casos, como o da bacteriose da mandioca, em que não há controle químico eficaz, sendo medidas de controle e manejo a única possibilidade de amenizar o problema. Como alternativa, estudos vem apontado a possibilidade de uso de metabólitos secundários de microrganismos, incluindo fungos da Antártica, no combate às *Xanthomonas* ssp. A presente pesquisa avaliou o potencial bactericida de extratos produzidos por 156 fungos isolados de diversas amostras de solo e sedimentos marinhos antárticos contra *X. euvesicatoria* e *X. ax.* pv. *manihotis*. Vinte e sete extratos foram bioativos para pelo menos uma das espécies de *Xanthomonas* testadas. Os extratos bioativos foram produzidos por 23 diferentes fungos, sendo que 9 foram isolados de amostras de sedimentos marinhos, 5 de solo abaixo de madeira podre, 6 de solo com biofilme e 3 isolados de solo abaixo de barra de ferro. O gênero de fungos *Pseudogymnoascus*, bastante comum na Antártica, foi predominante dentre os isolados foram produtores de compostos bioativos contra as espécies testadas.

Palavras-chave: *Xanthomonas*; metabólitos secundários; fungos; Antártica

ABSTRACT

Yet considerable technological advances in the agricultural sector have provided improvements in human well-being, thousands of people still face misery and hunger around the world. The progress achieved in the last century within the Green Revolution, despite having boosted global food production, has also brought catastrophic consequences to the natural environment. In addition, the world population continues to grow exponentially, especially in emerging regions such as the African and Asian continents. All these factors, coupled with the numerous constraints of agricultural production, pose a great threat to the planet's food security, as well as exorbitant economic losses. Among the agricultural limitations, phytopathologies caused by bacteria of the genus *Xanthomonas* respond by losses of production that can reach 100%, when in an epidemic situation. The tomato, pepper and cassava productions can be severely reduced when affected by *Xanthomonas euvesicatoria*, which causes bacterial spot in pepper and tomatoes, and *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, which causes cassava bacterial blight. The current fight for these diseases is based on the use of copper compounds, notably harmful to human and environmental health, but there are cases, such as cassava bacterial blight, in which there is no effective chemical control, and management measures are the only possibility of mitigating the problem. As an alternative, studies have indicated the possibility of using secondary metabolites of microorganisms, including Antarctic fungi, in the control of *Xanthomonas* spp. The present study evaluated the bactericidal potential of extracts produced by 156 fungi isolated from several soil samples and marine sediments against *X. euvesicatoria* and *X. ax. pv. manihotis*. Twenty-seven extracts were bioactive for at least one of the *Xanthomonas* species tested. Bioactive extracts were produced by 23 different fungi, of which 9 were isolated from marine sediment samples, 5 from soil under rotten wood, 6 from soil with biofilm and 3 soil isolates below iron bar. The genus of fungi *Pseudogymnoascus*, very common in Antarctica, was predominant among the isolates were producers of bioactive compounds against the species tested.

Keywords: *Xanthomonas*; secondary metabolites; fungi; Antarctica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção mundial de alimentos básicos no ano de 2004	16
Figura 2 - Gráfico do crescimento populacional mundial entre 1990 – 2016.	17
Figura 3 - Produção mundial de mandioca no ano de 2017	19
Figura 4 - Produção nacional de mandioca no ano de 2017 por região fisiográfica	20
Figura 5 - Distribuição mundial da bacteriose da mandioca	24
Figura 6 – Sintomas de bacteriose da mandioca causada por <i>Xam</i>	26
Figura 7 – Sintomas da mancha bacteriana em tomateiro e pimentão	28
Figura 8 - Distribuição mundial da <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , bactéria causadora da mancha bacteriana no tomateiro.	29
Figura 9 – Locais de coleta dos fungos filamentosos utilizados na pesquisa.....	32
Figura 10 - Distribuição percentual de gêneros taxonômicos dos 45 fungos isolados de sedimentos marinhos, na Antártica, utilizados nos bioensaios.....	34
Figura 11 - Processo de extração dos metabólitos.....	35
Figura 12 - Processo de concentração das amostras.....	36
Figura 13 - Placas contendo colônias de <i>Xanthomonas</i> após incubação a 29°C por 48 horas.	37
Figura 14 – Inóculos bacterianos.....	37
Figura 15 - Placas de 96 poços utilizadas nos bioensaios após a adição do corante resazurina	38
Figura 16 – Aplicação do corante resazurina	38
Figura 17 - Leitura em espectrofotômetro de fluorescência Biotek Synergy H1MFD (comprimento de onda de excitação: 530 nm; comprimento de onda de emissão: 590 nm)....	38
Figura 18 - Esquema de montagem das placas para as triagens	39
Figura 19 - Esquema de preparo das placas para os bioensaios completos, com oito concentrações de cada amostra (C1 a C8).	40
Figura 20 - Exemplo de gráfico com curva de regressão de um extrato e sua respectiva equação polinomial.....	41
Figura 21 – Tipo de carimbo utilizado para a inoculação na placa de Petri com meio NYG sólido	41
Figura 22 - Após 48 horas de incubação, as placas são avaliadas visualmente.	42
Figura 23 - Relação dose-resposta dos extratos intracelulares produzidos pelos isolados 5DC115I e 4DC615I contra <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	46

Figura 24 - Relação dose-resposta dos extratos extracelulares produzidos pelos isolados 6DC1I e 6D-3C1III contra <i>Xae</i>	46
Figura 25 - Relação dose-resposta dos extratos extracelulares produzidos pelos isolados 6DC1I e 6D-3C1III contra <i>Xae</i> e <i>Xam</i>	47
Figura 26 - Relação dose-resposta dos extratos extracelulares produzidos pelos isolados 5A-1C715III, 2A-1C115II, 5D-3C115II, 2B-1C115III e 5A-1C315III nos ensaios contra <i>Xam</i>	48
Figura 27 - Relação dose-resposta dos extratos extracelulares produzidos por fungos isolados de solo abaixo de madeira podre e bioativos contra <i>Xam</i> . Suas respectivas curvas polinomiais estão representadas.	53
Figura 28 - Relação dose-resposta dos extratos intracelulares produzidos por fungos isolados de solo abaixo de madeira podre e bioativos contra <i>Xam</i> . Suas respectivas curvas polinomiais estão representadas.	54
Figura 29 - Relação dose-resposta dos extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception, Antártica.	56
Figura 30 - Relação dose-resposta dos extratos intracelulares 6 Bi' e B Bi contra <i>Xae</i> e <i>Xam</i>	59
Figura 31 - Relação dose-resposta dos extratos A Bi e 7 Bi intracelulares contra <i>Xam</i>	59
Figura 32 - Relação dose-resposta dos extratos 10.1 Bi e 10.1 WB intracelulares contra <i>Xae</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - 12 maiores produtores de tomate no mundo.	21
Tabela 2 - Relação de locais de coleta e substrato dos isolados utilizados na pesquisa.....	33
Tabela 3 - Relação de gêneros taxonômicos dos 45 fungos coletados em sedimentos marinhos, na Antártica, utilizados nos bioensaios.....	33
Tabela 4 - Resultados das triagens para todos os extratos de fungos isolados em sedimentos marinhos, Antártica.	43
Tabela 5 - Gênero dos isolados de sedimentos marinhos cujos extratos foram bioativos contra uma ou ambas as espécies de <i>Xanthomonas</i>	44
Tabela 6 - Comparação de bioatividade dos extratos de sedimentos marinhos contra outras espécies de <i>Xanthomonas</i>	49
Tabela 7 - Valores de MIC 90 (em mg/mL) e seus respectivos desvios padrão para os extratos de isolados de sedimentos marinhos bioativos contra <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (<i>Xae</i>) e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (<i>Xam</i>).	50
Tabela 8 - Resultados da análise de MBC para extratos produzidos por isolados de sedimentos marinhos positivos contra <i>Xae</i> e <i>Xam</i>	51
Tabela 9 - Resultados das triagens para todos os extratos de fungos isolados em solo abaixo de madeira podre na Ilha Deception, Antártica testados contra <i>Xam</i> e <i>Xae</i>	52
Tabela 10 - Resultados das triagens para os extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception, Antártica, contra <i>Xae</i> e <i>Xam</i>	55
Tabela 11 - Resultados para triagens com extratos de fungos isolados em biofilme de solo na Ilha Deception – Whalers Bay contra <i>Xae</i> e <i>Xam</i>	58
Tabela 12 - Valores de MIC 90 (em mg/mL) e seus respectivos desvios padrão para os extratos intracelulares bioativos contra <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (<i>Xae</i>) e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (<i>Xam</i>).	61
Tabela 13 - Triagem qualitativa dos extratos quanto à atividade antibacteriana contra <i>X. euvesicatoria</i> e <i>X. ax. pv. manihotis</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Xam *Xanthomonas axonopodis* patovar *manihotis*

Xae *Xanthomonas euvesicatoria*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Agricultura, crescimento populacional e sistemas de produção	16
2.2 Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>).....	18
2.3 Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	21
2.4 Doenças agrícolas e o impacto na segurança alimentar	22
2.5 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> causadora da bacteriose na mandioca	24
2.6 <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , causadora da mancha bacteriana no pimentão e tomate	27
2.7 Alternativas ao combate químico: biotecnologia de microrganismos e metabólitos secundários	29
3 OBJETIVO DA PESQUISA	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Bioensaios	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica	43
5.2 Resultados dos bioensaios contra <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (Xae).....	45
5.3 Resultados dos bioensaios contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (Xam).....	47
5.4 Concentração Mínima Inibitória (MIC 90)	50
5.5 Concentração Mínima Bactericida (MBC)	51
5.6 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de madeira podre, coletados na Ilha de Deception (Pendulum Cove).....	52
5.7 Concentração Mínima Inibitória (MIC 90) e Concentração Mínima Bactericida (MBC)	55
5.8 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception, Antártica.....	55
5.9 Concentração Mínima Inibitória (MIC 90) e Concentração Mínima Bactericida (MBC)	57

5.10 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de biofilme em solo na Ilha Deception (Whalers Bay), Antártica.	57
5.11 Concentração Mínima Inibitória (MIC 90) e Concentração Mínima Bactericida (MBC)	61
5.12 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de gelo e solo alagado na Ilha Rei George, Antártica.	61
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

É fato que a humanidade vem obtendo grandes progressos na melhoria de seu bem-estar, graças a avanços tecnológicos, principalmente agrícolas. A revolução verde proporcionou um imenso processo de industrialização e globalização da alimentação e agricultura (FAO, 2017).

Entretanto, no mundo todo, bilhões de pessoas ainda passam fome. A população mundial é crescente, principalmente nos continentes asiático e africano. Até o ano 2100, espera-se que a Ásia e a África abriguem, conjuntamente, uma população de 9 dos 11 bilhões projetados que habitarão a Terra (FAO, 2017).

O fato é que a taxa atual de progresso na qualidade de vida e bem-estar humano, ainda que significativa, não será suficiente para erradicar a fome até 2030, nem mesmo 2050. Manter os mesmos processos e sistemas de produção no setor da agricultura não é mais uma opção. Grandes transformações dos sistemas agrícolas, economias rurais e gestão de recursos naturais serão necessários para enfrentar os múltiplos desafios que se apresentam para extrair todo o potencial da agricultura e garantir um futuro seguro e saudável para todos.

Na África, a mandioca representa a principal fonte alimentícia para cerca de 60% da população. No Brasil, nas regiões onde a estiagem é prolongada, como o Nordeste, seu uso como reserva alimentar é essencial. O cultivo da mandioca foi estimulado pela necessidade de produzir alimentos para atender à crescente demanda mundial, além de ser uma fonte de carboidratos com baixos custos de produção (O'HAIR, 1998). Relatórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) apontam o número de pessoas que obtém suas reservas de carboidratos habituais por meio da *Manihot esculenta* em torno de 600-700 milhões em todo o globo (FOLEGATTI; MATSUURA, 2008).

Assim como muitas outras, a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é frequentemente acometida por pragas e doenças que ocasionam a diminuição do rendimento das lavouras até sua perda total (FAO, 2003).

A mandioca pode ser hospedeira de mais de 30 agentes diferentes, como bactérias, fungos, vírus ou similares, além de fitoplasma (micoplasmas). As principais doenças da cultura no Brasil, responsáveis por causar altos prejuízos e elevar os custos da lavoura com medidas de controle, especialmente insumos, são a podridão-radicular, a bacteriose, o superbrotamento e as viroses (MATTOS et al., 2006). O agente causador da fitopatologia conhecida como bacteriose (ou ferrugem, queima, murcha) da mandioca (*Manihot esculenta*) é a espécie bacteriana *Xanthomonas axonopodis* patovar *manihotis* (Xam) (VAUTERIN et al., 1995). É a

principal fitopatologia do cultivo e, nos últimos anos, uma recorrência significativa da doença foi relatada em diferentes regiões da África e da Ásia (MANSFIELD et al., 2012).

Já o tomate desponta no ranking das hortaliças mais consumidas no mundo. 177 milhões de toneladas de tomates foram cultivadas globalmente em 2016, significando um aumento de quase 30% no referente à última década. Aproximadamente 5 milhões de hectares de tomates foram plantados em todo o planeta (MULDERIJ, 2018). O fruto da planta *Solanum lycopersicum* é uma das *commodities* em comestíveis mais consumidas no mundo atual e ocupa a maior categoria de vegetais do mundo, em torno de 17%.

A espécie é nativa da América do Sul e da América Central, mas hoje é cultivado por pessoas em todo o mundo, especialmente em climas temperados e estufas (THE DAILY RECORDS, 2018). O Brasil, já no ano de 2018, é o nono maior produtor mundial (Tabela 1).

A mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas euvesicatoria*, atinge plantações de tomate e pimentão e é um grave problema em regiões do planeta com climas tropicais, subtropicais e temperados (BOUZAR et al., 2004). A doença tem se tornado grande empecilho no processamento de tomateiros no Brasil devido às condições ambientais favoráveis, falta de cultivares resistentes ou falta de controle químico eficiente (BOUZAR et al., 2004).

Quando a doença ocorre após o transplanto e as condições ambientais estão favoráveis, é comum que haja perda de toda a safra. O controle químico tem sido feito à base de compostos cúpricos combinados com Manebe ($C_4H_6MnN_2S_4$), um fungicida. Porém essa mistura não tem mostrado eficácia. A doença é de difícil controle quando instalada a epidemia e alguns produtores de pimentão chegam a devastar plantações inteiras por causa do elevado custo e dificuldade de controle (RITCHIE, 2000).

Como alternativa aos problemas no combate a inúmeras fitopatologias presentes nas diversas produções, a busca por novos compostos antimicrobianos tem evoluído rapidamente nas últimas décadas (ANDERSSON; HUGHES, 2011).

A produção de metabólitos secundários responde pela atividade antagonista que os microrganismos desempenham quando da aplicação de controle biológico (SILVA et al., 2001). Esses metabólitos secundários bioativos têm gerado alto interesse como possíveis alternativas aos produtos químicos convencionais. São compostos que possuem estruturas químicas específicas e complexas e muitos deles são reconhecidos como substâncias de alto potencial contra doenças humanas infecciosas e cânceres, além do combate a fitopatógenos da agricultura, sejam eles bactérias ou fungos.

A literatura relata o uso de metabólitos secundários de microrganismos, tais como bactérias e fungos, contra diversas espécies de *Xanthomonas* (MURATE et al., 2015; SPAGO et al., 2014).

Dentre as possibilidades de microrganismos investigados na busca por metabólitos secundários bioativos, destacam-se os oriundos de ambientes distintos, tais como os endófitos de plantas selvagens, fungos da Antártica e fungos marinhos (FURBINO et al., 2014; CHEUNG et al., 2014). Com a maior reserva de gelo (cerca de 90%) e água doce (cerca de 70%) do planeta, a Antártica apresenta o clima mais seco e frio da Terra e é o principal regulador térmico do planeta, exercendo controle das circulações atmosféricas e oceânicas (HOLDGATE, 1977; OVSTEDAL et al., 2001).

Em 2002, um estudo apontou atividade contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *X. vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *phaseol*, causadoras de doenças nas culturas de soja, tomate e feijão, respectivamente, de actinobactérias do solo antártico (MONCHEVA et al., 2002). Actinobactérias da região também mostraram atividade contra outras bactérias e fungos fitopatógenos (NEDIALKOVA, 2005).

Assim, a presente pesquisa objetiva avaliar o potencial de fungos filamentosos da Antártica em produzir compostos com capacidade de inibir o crescimento bacteriano das espécies *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e *Xanthomonas euvesicatoria*, causadoras da bacteriose na mandioca e da mancha bacteriana em tomateiro e pimentão, respectivamente.

Foram testados extratos contendo metabólitos secundários produzidos por 156 fungos isolados de diversas amostras de solo e sedimentos marinhos da Antártica contra as espécies bacterianas já mencionadas.

Vinte e sete extratos foram bioativos para pelo menos uma das espécies de *Xanthomonas* testadas. Os extratos bioativos foram produzidos por 23 diferentes fungos, sendo que 9 foram isolados de amostras de sedimentos marinhos (2A-1C115II; 2B-1C115III; 5A-1C315III; 5A-1C715III; 5D-3C115II; 6D-3C1III; 6DC1I; 4DC615I e 5DC115I), 5 de solo sob madeira podre (10 MP; 10.5 MP; 10.2 MP; 10.1 MP; 10.8 MP e CMP), 6 de solo com biofilme (10.1 WB; 10.1 Bi; 6 Bi; B Bi; A Bi; 7 Bi) e 3 isolados de solo sob barra de ferro (10.3 FE; 10.4 FE; D FE).

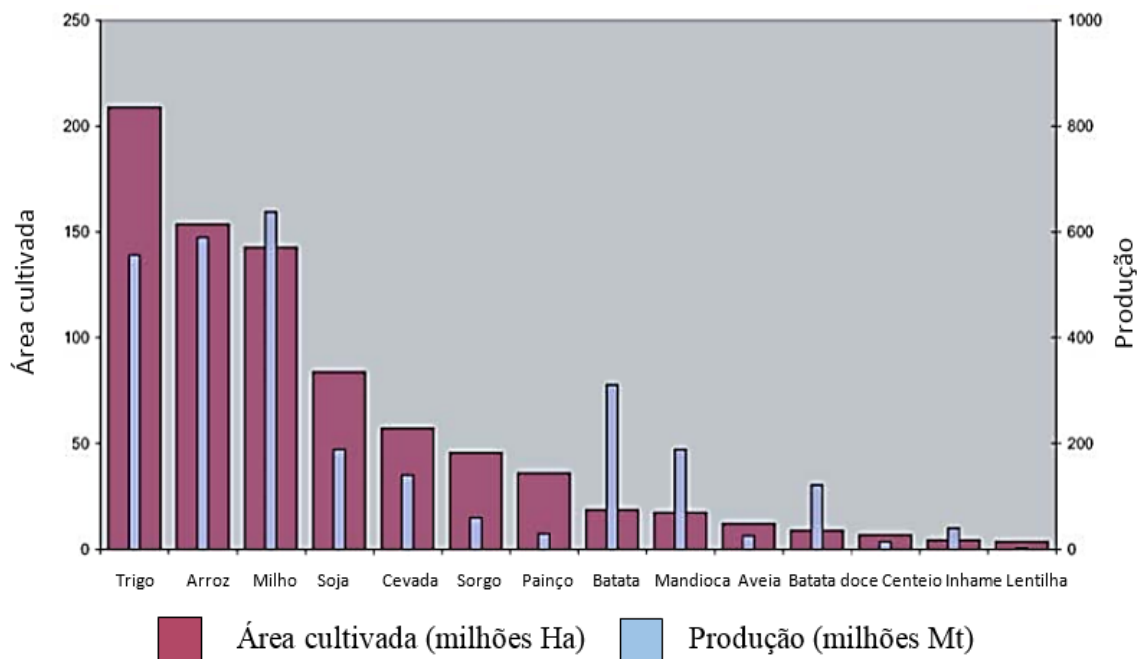
O gênero *Pseudogymnoascus*, comum na Antártica, predominou dentre os isolados cujos gêneros taxonômicos foram identificados como produtores de compostos bioativos contra as espécies testadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agricultura, crescimento populacional e sistemas de produção

Quatorze espécies de plantas cultivadas (trigo, arroz, milho, sorgo, cevada, soja, painço, batata, mandioca, aveia, batata-doce, centeio, inhame e lentilha) fornecem a maior parte dos alimentos para consumo humano no mundo todo (STRANGE; SCOTT, 2005) (Figura 1). Além disso, muitas outras plantas menos cultivadas, como o tomate, ainda cumprem importantes exigências nutricionais em áreas menos abrangentes do globo (STRANGE; SCOTT, 2005).

Figura 1 - Produção mundial de alimentos básicos no ano de 2004



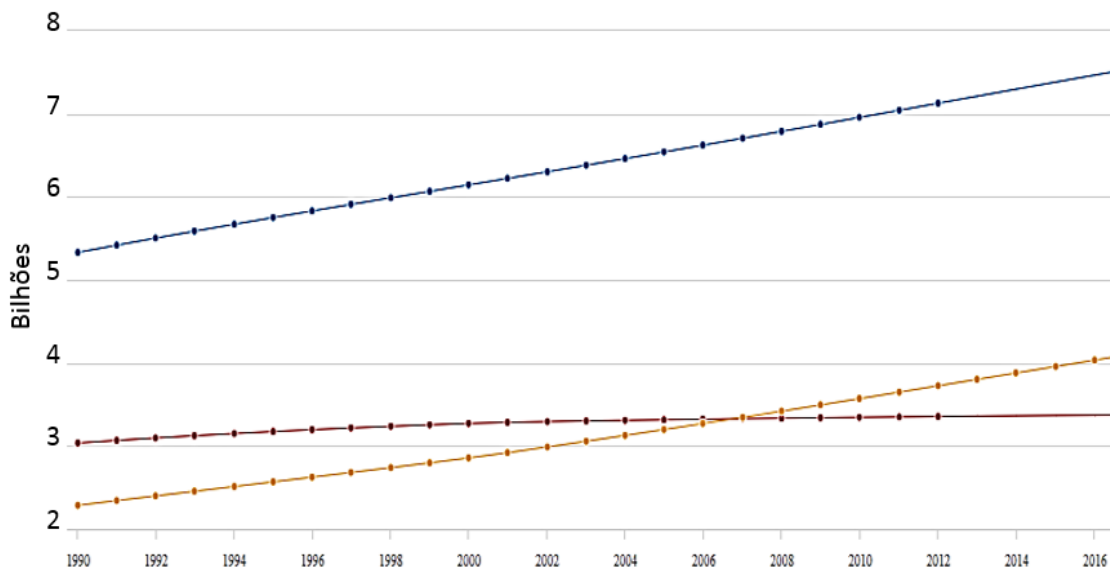
Fonte: Strange; Scott, 2005

No último século, graças à crescente evolução da tecnologia, à rápida urbanização e aos avanços nos sistemas de produção agrícola, o mundo obteve rápido progresso na melhoria do bem-estar humano. Nesse período, em virtude da revolução verde, ocorreu um imenso processo de industrialização e globalização da alimentação e agricultura (FAO, 2017). Em meio a tanto progresso, todavia, bilhões de pessoas ainda enfrentam miséria, desigualdade, desemprego, degradação ambiental, doenças e privações. Mais de 800 milhões de pessoas no mundo não têm uma dieta adequada, ou seja, passam fome. 1,3 bilhão de indivíduos vive com menos de US\$ 1

por dia e pelo menos 10% da produção global de alimentos é perdida para doenças de plantas (CHRISTOU; TWYMAN, 2004; FAO, 2016; JAMES, 1998).

Ao que tudo indica, entretanto, a demografia mundial mudará radicalmente nas próximas décadas e no final do século, aumentando consideravelmente a demanda por alimentos no mundo todo (FAO, 2015). O gráfico da Figura 2 mostra a dinâmica populacional ao longo dos anos no período de 1990 – 2016.

Figura 2 - Gráfico do crescimento populacional mundial entre 1990 – 2016.



Legenda: — População Total — População Rural — População Urbana

Fonte: FAOSTAT, modificado.

Muito do progresso da humanidade chegou a um considerável custo para o meio ambiente. A expansão da produção de alimentos e o crescimento econômico vêm, muitas vezes, acompanhados de alto preço para o ambiente natural. Devido a uma série de fatores, incluindo as alterações climáticas, a pressão sobre recursos naturais, os sub investimentos na agricultura e as lacunas na tecnologia, manter o ritmo de aumento de produção pode ser muito difícil (FAO, 2017).

Processos de produção globalmente integrados trouxeram muitos benefícios, porém há a necessidade de orientá-los para resultados mais equitativos e sustentáveis. O aumento do uso da terra, irrigação e agroquímicos desempenhou um papel importante no crescimento da produção agrícola. Contudo, agora reconhece-se que os ganhos eram frequentemente acompanhados de efeitos sobre a base de recursos naturais da agricultura, incluindo a degradação do solo, a salinização de áreas irrigadas, a extração excessiva de água subterrânea,

a resistência a pragas e a erosão da biodiversidade (FAO, 2017). A agricultura também danificou o ambiente através do desmatamento, emissão de gases de efeito estufa e poluição, principalmente por nitrato, de corpos d'água (FAO, 2011).

Manter os mesmos processos e sistemas de produção no setor da agricultura não é mais uma opção. Grandes transformações dos sistemas agrícolas, economias rurais e gestão de recursos naturais serão necessárias para enfrentar os múltiplos desafios que se apresentam para extrair todo o potencial da agricultura com o objetivo de garantir um futuro seguro e saudável para todos. A chave para o crescimento sustentável da agricultura é o uso mais eficiente da terra, do trabalho e de outros insumos através do progresso tecnológico, da inovação social e de novos modelos de negócios (OCDE, 2011).

Para que a agricultura responda aos desafios futuros, a inovação não só terá de melhorar a eficiência com as quais as entradas são transformadas em saídas, mas também conservar recursos e reduzir o desperdício (TROELL et al., 2014).

2.2 Mandioca (*Manihot esculenta*)

A *Manihot esculenta* Crantz é uma das 98 espécies pertencentes à família Euphorbiaceae e a única utilizada fins de alimentação. O cultivo é favorável em climas tropicais e subtropicais dentro de uma faixa de temperatura-limite de 20°C a 27°C (MATTOS et al., 2006).

Estudos apontam que a planta ancestral da mandioca pertence à vegetação de galeria associada a rios, na zona de transição entre a floresta Amazônica e o Cerrado, próxima às fronteiras entre Peru e Brasil (CARVALHO, 2005). Recentes pesquisas arqueológicas indicam a região amazonense como sendo o berço da mandioca, mas outras versões sustentam que seu surgimento se deu no Peru (região dos Andes) ou mesmo na África. De qualquer forma, o Brasil Central é a região nacional que abriga a maior diversidade biológica de mandioca cultivada e cerca de 80% de espécies silvestres com alto polimorfismo vegetativo encontram-se em solo brasileiro (SEBRAE, 2008).

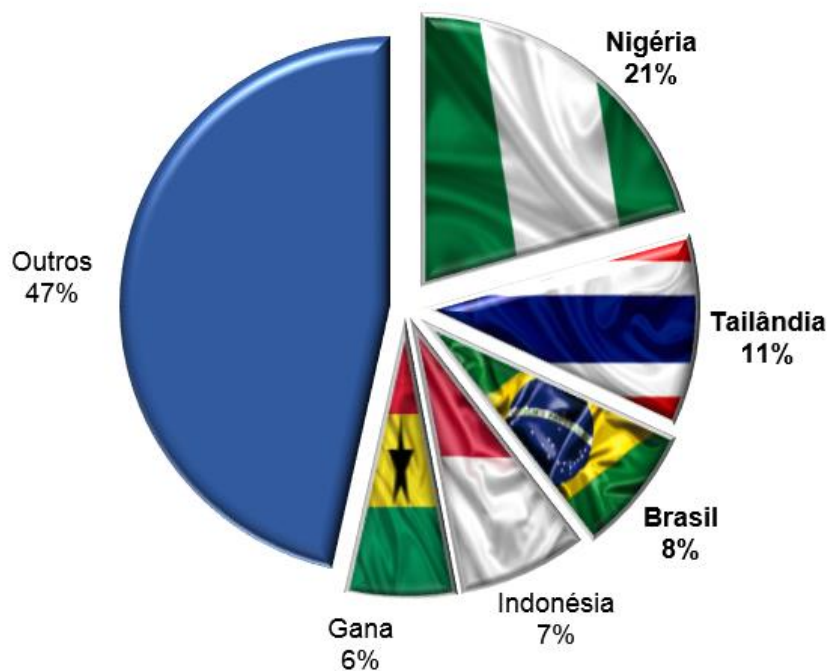
Trata-se uma espécie cianogênica, ou seja, apresenta compostos cianicos em diferentes concentrações nas diversas partes do indivíduo. As variedades de mandioca brava (com concentrações de cianeto acima de 100 mg/kg de peso na raiz fresca) são destinadas, quando com fins alimentares, para a produção de farinha ou fécula (amido) e possuem sabor amargo. Já as mandiocas mansas (com concentrações de cianeto abaixo de 100 mg/kg de peso na raiz fresca) são consumidas *in natura*, com preparo doméstico, sendo geralmente fritas ou cozidas.

Os processos de cocção e fritura, além do processamento industrial, reduzem a toxicidade e tornam o consumo humano e animal seguros (PEREZ, 2007).

O cultivo da mandioca foi estimulado pela necessidade de produzir alimentos para atender à crescente demanda mundial, além de ser uma fonte de carboidratos com baixos custos de produção (O'HAIR, 1998). Relatórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) apontam que o número de pessoas que obtêm suas reservas de carboidratos habituais por meio da *Manihot esculenta* está em torno de 600-700 milhões em todo o globo (FOLEGATTI; MATSUURA, 2008). O maior crescimento dos cultivos está nos países africanos, dada a fácil adaptação ao clima e pouca ou nenhuma necessidade de insumos (GROXKO, 2011).

Na África, a mandioca representa a principal fonte alimentícia para cerca de 60% da população. No Brasil, nas regiões onde a estiagem é prolongada, como o Nordeste, seu uso como reserva alimentar é essencial. A Nigéria, líder mundial da produção de mandioca, passou de 10 milhões de toneladas produzidas, em 1970, para 53 milhões de toneladas, em 2017. A Tailândia ocupou, no mesmo ano, com produção de 31 milhões de toneladas, o segundo lugar do ranking. Em terceiro lugar, com uma produção de 21 milhões de toneladas, figura o Brasil (Figura 3) (IBGE).

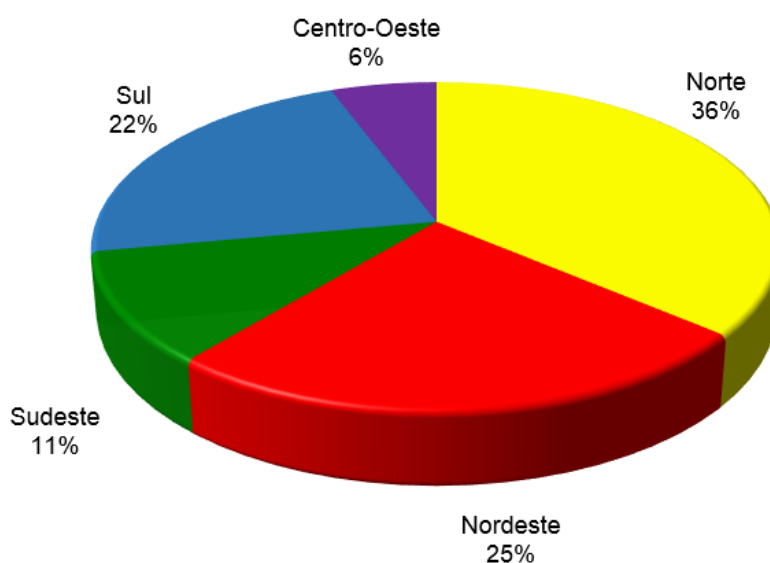
Figura 3 - Produção mundial de mandioca no ano de 2017



Fonte: IBGE, elaborado pela autora.

No Brasil, a mandioca está presente em todo o território e pode ser explorada em duas formas: cultivos de raízes destinadas à subsistência humana e animal e lavouras de grandes extensões, cujos principais consumidores são fecularias e farinharias. Há também unidades menores, geralmente de produção artesanal e familiar, destinadas ao fornecimento de goma ou polvilho azedo, principalmente no Nordeste do país. Apesar das características artesanais, o Nordeste é uma região de destaque na produção brasileira de mandioca (Figura 4). Em 2011, participou em 33% da produção total do país (FAO, 2013) e, em 2017, figurou em segundo lugar, com uma produção de 5 milhões de toneladas (25% do total), logo atrás da região Norte – líder nacional em 2017 – que produziu cerca de 7,5 milhões de toneladas (36% do total) (FAOSTAT, 2018).

Figura 4 - Produção nacional de mandioca no ano de 2017 por região fisiográfica



Fonte: FAOSTAT, elaborado pela autora.

Assim como muitas outras, a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é frequentemente acometida por pragas e doenças que ocasionam a diminuição do rendimento das lavouras ou até mesmo sua perda total (FAO, 2003). A mandioca pode ser hospedeira de mais de 30 agentes diferentes, como bactérias, fungos, vírus ou similares, além do fitoplasma (micoplasmas). As principais doenças da cultura no Brasil, responsáveis por causar altos prejuízos e elevarem os custos da lavoura com medidas de controle, especialmente insumos, são a podridão-radicular, a bacteriose (*X.ax.pv. manihotis*), o superbrotamento e as viroses (MATTOS et al., 2006).

Sendo um dos alimentos básicos na dieta de quase 600 milhões de pessoas nas regiões tropicais do mundo (MANSFIELD et al., 2012) e um dos principais alimentos relacionados à segurança alimentar na África e América do Sul (ARRIETA-ORTIZ et al., 2013), o conhecimento relacionado à proteção das lavouras contra os limitantes da cultura torna-se cada vez mais importante. À medida que o cultivo vem crescendo e ocorrendo ao longo de todo o ano, principalmente em regiões voltadas ao processamento industrial, crescem também as áreas plantadas. Como consequência, a incidência de pragas e doenças também aumenta (FAO, 2003).

2.3 Tomate (*Solanum lycopersicum*)

O tomate pertence à família Solanacea e figura no ranking das hortaliças mais consumidas no mundo. 177 milhões de toneladas de tomates foram cultivadas globalmente em 2016, significando um aumento de quase 30% no referente à última década. Aproximadamente 5 milhões de hectares de tomates foram plantados em todo o planeta (MULDERIJ, 2018). O Brasil, já no ano de 2018, é o nono maior produtor mundial (Tabela 1).

Tabela 1 - 12 maiores produtores de tomate no mundo.

País	Produção (em milhões de toneladas)
1. China	56.8
2. Índia	18.7
3. EUA	14.5
4. Turquia	11.9
5. Egito	8.3
6. Irã	6.0
7. Itália	5.6
8. Espanha	4.9
9. Brasil	4.3
10. México	3.53
11. Rússia	2.81
12. Uzbequistão	2.28

Fonte: THE DAILY RECORDS, 2018, modificado.

A produção do tomate no Brasil possui duas destinações: industrial e “de mesa”. A cadeia produtiva destinada ao processamento industrial pode ser considerada a mais importante dentre as hortaliças cultivadas no país, sendo realizada desde o começo do século XX. Hoje, o país é o maior produtor de tomate para processamento industrial e o maior consumidor de derivados de tomate da América do Sul. Trata-se de um cultivo que exige alto nível tecnológico e intensa mão de obra, dando-lhe elevada importância econômica e social (MATTOS et al., 2006).

Os produtos derivados do tomate, assim como todos os destinados ao processamento em larga escala, sofrem influência direta do mercado internacional nos preços. Assim, espera-se que a produção seja beneficiada com tecnologias que busquem reduzir custos em sua produção e elevar o nível de produtividade, rendimento e qualidade. Por exemplo, a composição dos frutos pode e já vem sendo alterada geneticamente, a fim de selecionar cultivares com características interessantes para seu processamento. Em sua composição, o fruto do tomateiro possui cerca de 93-95% de água, sendo o restante preenchido por compostos inorgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em álcool e outros compostos. Ainda que as vitaminas estejam pouco presentes, do ponto de vista nutricional, esse fruto representa boa parte do consumo diário mínimo adequado (MATTOS et al., 2006).

2.4 Doenças agrícolas e o impacto na segurança alimentar

A segurança alimentar é, em linhas gerais, uma medida do estado nutricional do indivíduo no contexto populacional da região onde habita (FAO, 2017). Países desenvolvidos, predominantemente os dos continentes Europeu e Norte-Americano, apresentam os melhores índices de segurança alimentar. Países em desenvolvimento ou subdesenvolvimento sofrem com os piores índices, e o continente Africano abriga os países que mais sofrem com o problema (THE ECONOMISTS GROUP, 2018).

A segurança alimentar mundial está ameaçada, entre outros fatores, por um aumento alarmante do número de surtos de pragas e doenças de plantas e animais, com amplos impactos econômicos, sociais e ambientais. A ameaça é maior particularmente nas regiões menos desenvolvidas, onde as populações estão crescendo mais rapidamente, a pobreza é endêmica, a população depende de alimentos produzidos localmente e a infraestrutura de extensão e pesquisa conta, muitas vezes, com poucos recursos (FAO 2017). Em termos de valor econômico, as doenças de plantas por si só custam à economia global cerca de US\$ 220 bilhões por ano (AGRIOS, 2005).

A globalização da agricultura fez com que as plantas passassem a ser cultivadas longe de seus centros de origem e, portanto, longe dos patógenos que co-evoluíram com elas (STRANGE; SCOTT, 2005). Como resultado, é improvável que tenham adquirido resistência a novas cepas de patógenos, os quais podem ter subsequentemente surgido no centro de origem. Também os efeitos das mudanças climáticas na dinâmica de pragas e doenças podem ser observados de várias maneiras, como o aumento na frequência de surtos, a expansão de pragas em novos ambientes, a evolução de novas cepas e tipos de pragas e o aumento da vulnerabilidade dos mecanismos de defesa das plantas (FAO 2017).

Alterações significativas na temperatura global, somadas à degradação dos recursos naturais, tais como desmatamento e desertificação de solos, contribuem para a alteração da dinâmica de pragas e doenças, além de tornar animais e plantas mais vulneráveis. Mudanças na temperatura, nos níveis de umidade e nas concentrações de gases atmosféricos podem estimular as taxas de crescimento e geração de plantas, fungos e insetos, alterando as interações entre pragas, seus inimigos naturais e seus hospedeiros. Mudanças climáticas também são responsáveis, em parte, pelo surgimento de novas fitopatologias. A dinâmica populacional das pragas é modificada pelas alterações climáticas de tal forma que surgem novos nichos ecológicos para o estabelecimento ou ressurgimento e disseminação de pragas e doenças (FAO 2017).

As doenças bacterianas, ou bacterioses, são um dos mais recorrentes e difíceis entraves enfrentados nas lavouras de todo o mundo. Isso é devido a sua rápida propagação, dificuldades de manejo, problemas no controle químico, e – principalmente – severidade das perdas das plantações afetadas (LEYNS, 1984).

O gênero de bactérias gram-negativas *Xanthomonas* é pertencente à classe Gamma do filo *Proteobacteria* e abriga principalmente patógenos para plantas de considerável importância econômica (RODRIGUEZ-R et al, 2012). Sabe-se que importantes culturas, como as de *Citrus* spp. (limão, laranja, limão e pomelo, entre outros), *Oryza* spp. (arroz), crucíferas (repolho, brócolis, couve-flor, rabanete e *Arabidopsis thaliana*), tomate, pimentão, banana e *Manihot esculenta* (mandioca), têm como principais doenças aquelas causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas*, com membros individuais apresentando alto grau de especificidade ao hospedeiro (HAYWARD, 1993).

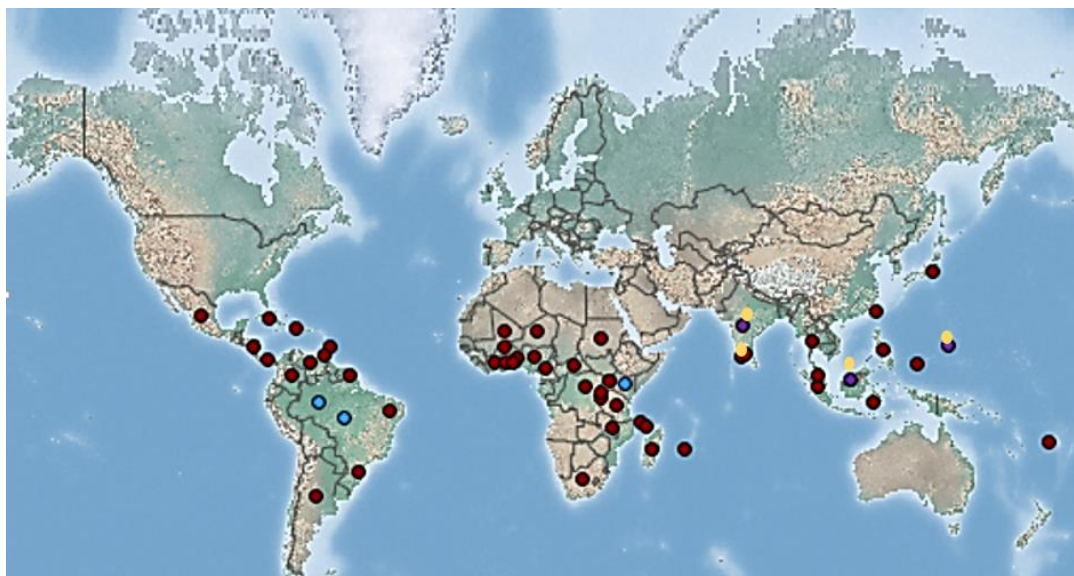
Um conjunto de estratégias é utilizado pelas bactérias do gênero *Xanthomonas* para interagir com o hospedeiro, podendo sobreviver em solo, sementes e restos culturais em interação com insetos e epifiticamente em plantas hospedeiras ou não. Essas formas de sobrevivência favorecem o desenvolvimento de epidemias (MARCUIZZO, 2009).

2.5 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causadora da bacteriose na mandioca

O agente causador da fitopatologia conhecida como bacteriose (ou ferrugem, queima, murcha) da mandioca (*Manihot esculenta*) é a espécie bacteriana *Xanthomonas axonopodis* patovar *manihotis* (*Xam*) (VAUTERIN et al., 1995). É a principal fitopatologia do cultivo e, nos últimos anos, uma recorrência significativa da doença foi relatada em diferentes regiões da África e da Ásia (MANSFIELD et al., 2012).

A doença foi descrita pela primeira vez em 1912, no Brasil (BONDAR, 1912). Durante a década de 1970, esse contágio foi encontrado na maioria das áreas de cultivo de mandioca da América Central e do Sul, além de Caribe, África e Ásia (BRADBURY, 1986). Logo após a detecção da praga bacteriana da mandioca na Nigéria, o Conselho Fitossanitário Inter-Africano divulgou uma advertência (ADDOH, 1972) e a Zâmbia introduziu medidas de quarentena sobre o movimento de estacas (LOGAN, 1974). Apesar de sua ocorrência generalizada, ainda existem áreas livres da *Xam*, incluindo o sul do Pacífico (Figura 5). As medidas de quarentena nessa área são particularmente relevantes.

Figura 5 - Distribuição mundial da bacteriose da mandioca



Fonte: CABI, 2018, modificado.

Amarelo: Localizado; **Vermelho:** Presente; **Azul:** Difundido; **Violeta:** Não consta

As colônias de isolados purificados de *Xam* tornam-se visíveis após 24 horas de incubação a 29°C, quando estriadas em placas contendo meio ágar-nutriente. Após 48 horas, as colônias apresentam consistência viscosa, medem cerca de 1mm de diâmetro, são de cor

esbranquiçada a creme (devido à ausência de síntese de xantomonadina pela espécie), convexas, lisas e brilhantes. Além da mandioca (*Manihot esculenta*), o fitopatógeno ataca as espécies selvagens *Manihot aipi*, *M. glaziovii* e *M. palmata*. As espécies de *Amaranthus*, *Panicum fasciculatum*, *Sida*, *Sorghum halepense* e várias espécies pertencentes às *Euphorbiaceae* foram identificadas como possíveis hospedeiras alternativas na Venezuela (MARCANO; TRUJILLO, 1982).

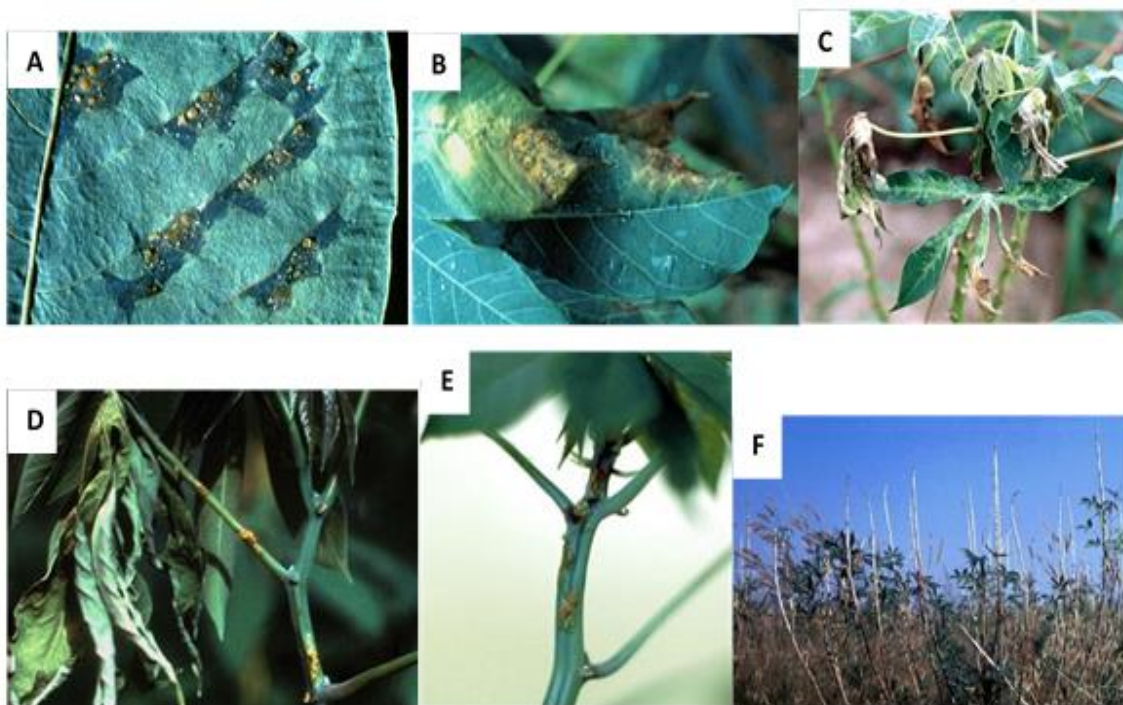
Sua estrutura genômica é semelhante à de outras *Xanthomonas*, especialmente *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas citri* pv. espécie de *citri* (ARRIETA-ORTIZ et al., 2013). A presença de 50 regiões no genoma com composição nucleotídica atípica e de 126 genes potencialmente únicos para *Xam* foram relatados. A relação dessas regiões com a virulência e patogenicidade poderia explicar vários aspectos da biologia desse patógeno, incluindo sua capacidade de colonizar tecidos vasculares e não vasculares de plantas de mandioca (ARRIETA-ORTIZ et al., 2013).

A *Xam* é principalmente um patógeno vascular e sobrevive epifiticamente até que condições favoráveis à infecção sejam atingidas. Feridas abertas e estômatos são as principais rotas de infecção por patógenos em plantas saudáveis (LOZANO; SEQUEIRA, 1974), e a doença é transmitida entre os ciclos da cultura através do uso de estacas infectadas (LÓPEZ; BERNAL, 2012). Infecções nos caules podem ser causadas por picadas de insetos, como em casos relatados na África central, nos quais identificou-se um vetor ocasional da bactéria – o inseto *Pseudotheraptus devastans*. De forma semelhante, também foi observada infecção caulinar por *Anoplecnemis madagascariensis* (BOURIQUET, 1939) e para a espécie de gafanhoto *Zonocerus variegatus* (MARAITE; MEYER, 1975).

Uma vez dentro da planta, as bactérias colonizam o mesófilo, gerando manchas foliares angulares como um dos primeiros sintomas. Nos estágios subsequentes, em plantas suscetíveis, a população de patógenos aumenta e atinge os tecidos vasculares, bloqueando o fluxo de nutrientes e gerando um processo de murchar (ou queima) que, em casos graves, termina com a morte da planta (LOZANO, 1986) (Figura 6).

Raramente a infecção atinge as raízes, somente em alguns cultivares muito suscetíveis (LOZANO, 1986). Nos frutos verdes, manchas expansivas encharcadas de água também podem ser observadas. Sementes altamente infectadas de frutos infectados podem ser deformadas, com manchas necróticas nos cotilédones e endosperma (LOZANO, 1986; FRISON; FELIU, 1991), e muito poucas germinam (LOZANO, 1986).

Figura 6 – Sintomas de bacteriose da mandioca causada por *Xam*.



Fonte: imagens A, B, D, E e F - H. Maraitte/Universite Catholique de Louvain; imagem C - Rob Williams/CAB International

(A) Manchas angulares em folhas de mandioca em condições de seca; observe gotículas de exsudação de pus nos pontos. (B) Sintomas nas folhas em condições úmidas. A ferrugem começa a partir de pequenos pontos angulares na ponta da folha. (C) Murcha típica da bacteriose. (D) Invasão sistêmica de um caule de mandioca, levando à formação de exsudato de goma e murcha súbita das folhas. (E) Exsudação no pestíolo. (F) Um clássico sintoma, que representa a morte da planta, chamado “aspecto de vela”.

Em áreas em que a bacteriose da mandioca ainda não ocorre, grande cuidado deve ser tomado na introdução do germoplasma. O material propagado vegetativamente deve ser introduzido como cultura de meristema, multiplicado *in vitro* e certificado como livre de doença. A semente botânica deve originar-se de áreas desfavoráveis para o desenvolvimento de doenças, ser tratada termicamente e plantada em quarentena (BORKAR; YUMLEMBAM, 2016). Detalhes podem ser encontrados nas diretrizes técnicas da FAO/IBPGR para o movimento seguro do germoplasma de mandioca (FRISON; FELIU, 1991).

Em áreas onde a doença bacteriana da mandioca já é disseminada, a incidência da doença pode ser reduzida pelo uso de material de plantio limpo. As ferramentas devem ser desinfetadas regularmente usando um bactericida. As estacas devem ser retiradas apenas das

plantações que se encontrem livres da doença por meio de inspeções no final da estação chuvosa. A rotação de culturas e pousio se mostrou muito bem-sucedida quando a nova cultura foi plantada com estacas não infectadas. A rotação ou pousio deve durar pelo menos uma estação chuvosa. Todos os restos de plantas infectadas e ervas daninhas em que a sobrevivência epifítica pode ocorrer devem ser removidos e queimados ou incorporados ao solo. Não existe controle químico eficaz atualmente empregado.

2.6 *Xanthomonas euvesicatoria*, causadora da mancha bacteriana no pimentão e tomate

Inicialmente, a bactéria fitopatogênica causadora da mancha bacteriana foi identificada como *Bacterium vesicatoria* e *B. exitiosum*, sendo posteriormente classificada como *Xanthomonas vesicatoria* e depois *X. campestris* pv. *vesicatoria* (YOUNG et al., 1978).

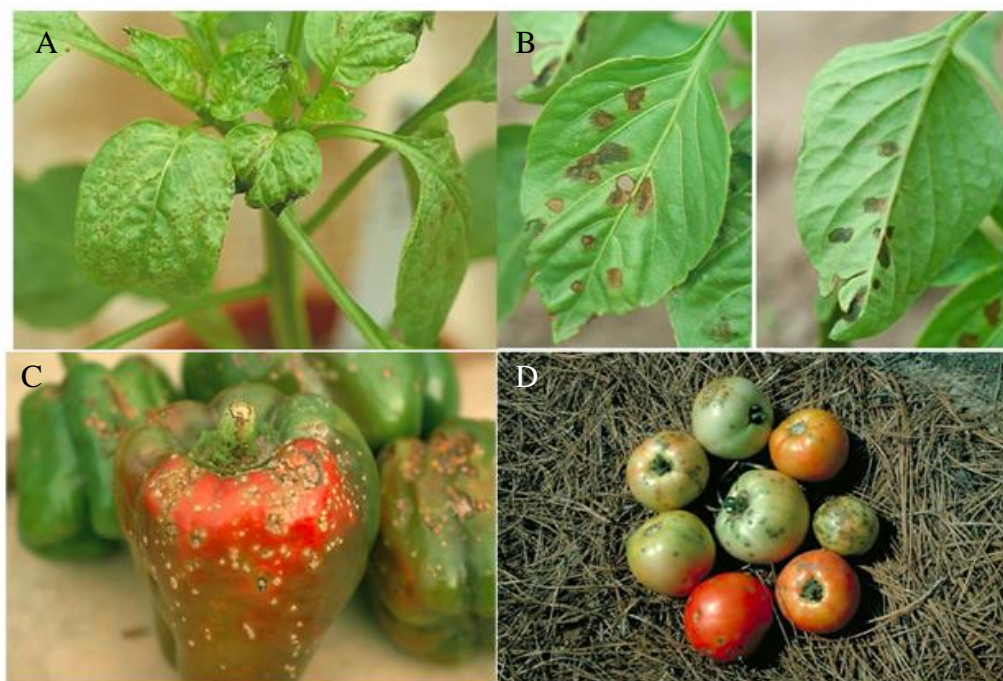
Em 1995, Vauterin et al. separaram *X. campestris* pv. *vesicatoria* em duas espécies, baseados em homologia de DNA: *X. vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Também *Pseudomonas gardneri* fora relatada como patógeno causador da mesma doença (SUTIC, 1957), mas em 1978 (LEY, 1978) e em 1966 (DYE, 1966) fora reclassificada como *Xanthomonas gardneri*.

Finalmente, Jones et al, em 2004, reclassificaram todas as *Xanthomonas* causadoras de manchas bacterianas nas quatro espécies, sendo que *Xanthomonas euvesicatoria* e *X. vesicatoria* causam doenças na pimenta e no tomate, enquanto que *X. perforans* e *X. gardneri* são conhecidos por infectar apenas o tomate. Recentemente, contudo, *X. perforans* foi isolada de planta de pimenta (POTNIS et al., 2015).

A *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xae*) infecta folhas, caules e frutos de pimentões ou tomateiros. Em pimentões, as lesões podem ser encontradas nos frutos, porém a perda maior é resultante da queda das flores e frutos jovens, ainda em desenvolvimento. A baixa qualidade dos frutos que permanecem inviabiliza sua comercialização, pois eles apresentam frequentemente lesões e deformações, além de danos causados pela exposição ao sol quando da perda das folhas (RITCHIE, 2000).

O desfolhamento ocorre de forma que a planta termina com folhas apenas na parte superior dos ramos, sendo mais comum em pimentões que em tomateiros. As folhas que permanecem murchas e contaminadas nos tomateiros causam uma aparência de queima nos frutos (Figura 7) (RITCHIE, 2000).

Figura 7 – Sintomas da mancha bacteriana em tomateiro e pimentão



Fonte: Ritchie, 2000.

(A) Lesões verde-amareladas em folhas jovens de pimentão. (B) Lesões angulares na face superior (esquerda) e inferior (direita) da folha. (C) Lesões de mancha bacteriana no fruto de pimentão e no pedúnculo. (D) Lesões de mancha bacteriana no fruto de tomate.

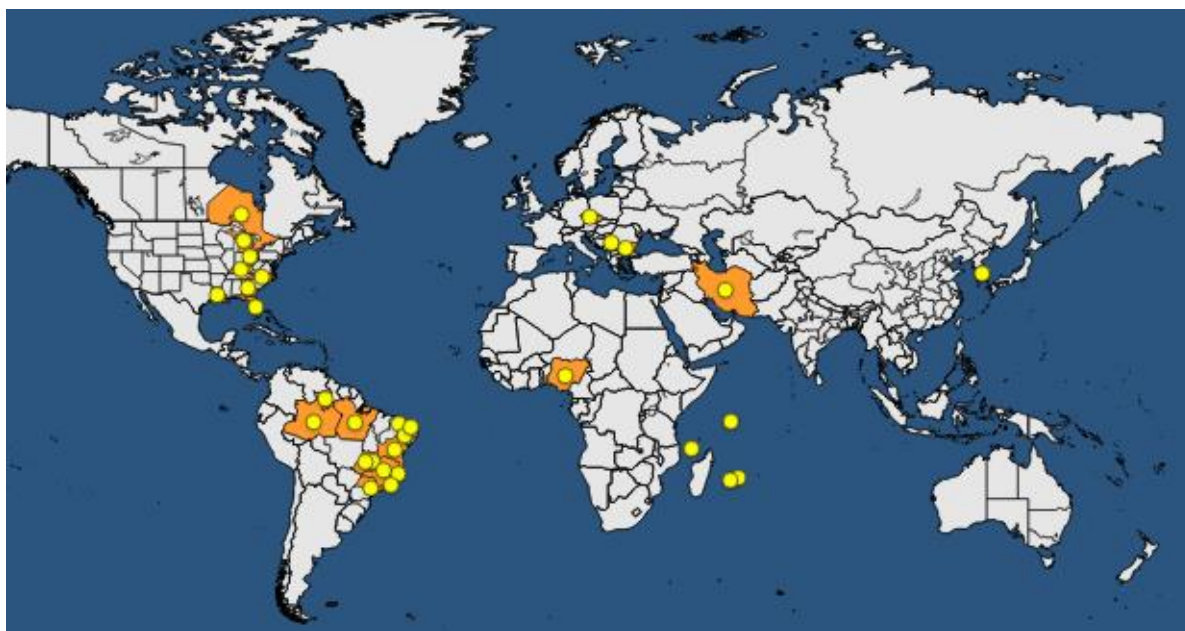
No solo, a *X. euvesicatoria* sobrevive por um período que varia de dias a semanas, de forma que sua sobrevivência está ligada frequentemente a restos de culturas doentes ou infectadas. Também a sobrevivência em associação a raízes de trigo e algumas espécies de ervas daninhas tem sido reportada. Nas regiões mais frias, a bactéria raramente sobrevive e, nessas áreas, a reintrodução acontece por meio de sementes ou mudas contaminadas. Na semente, a bactéria consegue sobreviver em associação, tanto de forma interna quanto externa. Quando externamente, os cotilédones podem ser contaminados por contato com o tegumento da semente e exibir lesões logo após a emergência do solo. O risco desse tipo de transmissão pode ser reduzido pelo tratamento da semente com hipoclorito de sódio ou de cálcio ou com fosfato trissódico (RITCHIE, 2000).

As bactérias que se encontram internamente são mais difíceis de acessar, e os tratamentos químicos e térmicos podem danificar e matar a semente também. A distribuição ocorre rapidamente por respingos de uma planta a outra, e a doença tornou-se uma ameaça, em especial à produção de mudas, que ocorre em bandejas que favorecem o desenvolvimento da

doença, visto que as plantas são irrigadas com frequência e estão adensadas. Também a chuva pode disseminá-las, assim como a aspersão em gotículas de água, quando agroquímicos são pulverizados sob alta pressão. A entrada ocorre através dos estômatos em folhas e ferimentos de frutos e folhas causados por vento, areia, granizo, entre outros. Os períodos de alta umidade relativa são favoráveis ao desenvolvimento da doença, o qual é retardado quando a umidade permanece baixa por longos períodos (RITCHIE, 2000).

A mancha bacteriana do tomate é um grave problema em regiões do planeta com climas tropicais, subtropicais e temperados (BOUZAR et al., 2004) (Figura 8). Apesar da mancha bacteriana ser uma doença de regiões cálidas e úmidas, ela também pode desenvolver-se em regiões áridas sob irrigação. A doença tem se tornado um grande empecilho no processamento de tomateiros no Brasil devido às condições ambientais favoráveis, falta de cultivares resistentes ou falta de controle químico eficiente (BOUZAR et al., 2004).

Figura 8 - Distribuição mundial da *Xanthomonas euvesicatoria*, bactéria causadora da mancha bacteriana no tomateiro.



Fonte: EPPO Global Database, 2018.

Os pontos amarelos representam locais onde a presença é confirmada. Trata-se de uma das doenças mais avassaladoras das culturas de pimentão e tomate.

2.7 Alternativas ao combate químico: biotecnologia de microrganismos e metabólitos secundários

Dada a importância do setor agrícola em questões sociais e econômicas no mundo todo, é plausível admitir que sejam necessários constantes aprimoramentos em técnicas de manejo de doenças, assim como no desenvolvimento de novas tecnologias para melhorias na produção. Apesar das crescentes inovações biotecnológicas voltadas ao melhoramento genético dos cultivares comerciais, as plantações ainda sofrem – como já mostrado – com muitas doenças e pragas, limitando a produção e prejudicando todo o setor do agronegócio.

Estudo realizado por Lim e colaboradores (2010) apresentou resultados positivos na atividade contra a *Xanthomonas oryzae*, bactéria responsável pela ferrugem bacteriana do arroz, de cinco metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phomopsis longicolla*. Outros estudos apontam que a bactéria *Pseudomonas sp.* produz metabólitos secundários com atividade significativa contra três espécies de *Xanthomonas*: *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *citri*, que atacam respectivamente as culturas de algodão, feijão e frutas cítricas (MURATE, et al. 2015; SPAGO et al., 2014).

Em condições extremas (baixa temperatura, ciclos de congelamento e descongelamento frequentes, baixa precipitação anual, ventos fortes, alta sublimação e evaporação e alta incidência de radiação ultravioleta), torna-se difícil a sobrevivência para a maioria das plantas e animais, exigindo da vida um potencial adaptativo extremamente engenhoso. Apesar disso, diversos organismos como bactérias, fungos, invertebrados, aves e mamíferos são encontrados em pleno vigor no continente Antártico (RUISI et al., 2007; ROSA et al., 2009; SHIVAJI; PRASAD, 2009).

Na Antártica, os microrganismos desempenham papel fundamental no transporte de energia e matéria orgânica e, muitas vezes, constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos na Antártica (CLARKE et al., 2003). A microbiota local é composta essencialmente por depósitos de micro-organismos precipitados pela neve ou transportados pelo vento, por correntes oceânicas e por animais (MURRAY et al., 1999).

Apesar de a maioria desses microrganismos não sobreviverem às condições extremas do ambiente, alguns permanecem em estado de latência (esporulados) ou viáveis sob condições basais de metabolismo (PRICE, 2000). Diferentemente de outros locais, essa região tem sido relativamente isolada do resto do planeta, desde a separação da Antártica de Gondwana, há 10 milhões de anos. Comunidades microbianas desse ambiente são frequentemente incomuns e interessantes, uma vez que têm sido sujeitas a longos períodos de isolamento com níveis relativamente baixos de perturbação (VINCENT, 2000).

Assim, a vida em ambientes frios requer uma vasta gama de características adaptativas em quase todos os níveis celulares e funções, e estudos recentes têm evidenciado o potencial de

fungos do ambiente antártico em produzir metabólitos secundários bioativos (FURBINO et al., 2014; GONÇALVES et al., 2015; HENRÍQUEZ et al., 2014), inclusive contra algumas espécies de *Xanthomonas* (*X. campestris*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* e *X. gardneri*) (SILBER, et al., 2013; MONCHEVA et al., 2002; NEDIALKOVA; NAIDENOVA, 2005; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2014).

Santiago e colaboradores (2012) observaram atividade contra o protozoário *Leishmania amazonensis* por parte de fungos endofíticos coletados na Antártica. A pesquisa realizada por Svahn e colaboradores (2015) indica que o *Penicillium nalgiovense*, isolado de uma amostra de solo da Antártica, produziu a anfotericina B, um antifúngico utilizado comercialmente com notável atividade contra *Candida albicans*. Actinobactérias da região também mostraram atividade contra outras bactérias e fungos fitopatógenos (NEDIALKOVA; NAIDENOVA, 2005). Extratos brutos obtidos por Malinova e colaboradores (2014; 2015) e produzidos por microrganismos isolados do solo da Antártica resultaram em atividade contra a *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas gardneri*, causadoras da mancha bacteriana na pimenta.

Em 2002, um estudo apontou atividade contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *X. vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *phaseol*, causadoras respectivamente de doenças nas culturas de soja, tomate e feijão, por parte de actinobactérias do solo antártico (MONCHEVA et al., 2002). Actinobactérias da região também mostraram atividade contra outras bactérias e fungos fitopatógenos (NEDIALKOVA; NAIDENOVA, 2005). Extratos brutos obtidos por Malinova e colaboradores (2014; 2015) e produzidos por microrganismos isolados do solo da Antártica resultaram em atividade contra a *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas gardneri*, causadoras da mancha bacteriana na pimenta. Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou ação microbiana de extratos produzidos por fungos antárticos, incluindo alguns dos utilizados nos bioensaios desta pesquisa, contra as espécies *X. citri* subsp. *citri* e *X. ax.* pv. *passiflorae* (VIEIRA et al., 2018; PÚRIC et al., 2018)

3 OBJETIVO DA PESQUISA

Avaliar o potencial de fungos filamentosos da Antártica em produzir compostos com capacidade de inibir o crescimento bacteriano das espécies *Xanthomonas axonopodis* pv.

manihotis e *Xanthomonas euvesicatoria*, causadoras da bacteriose na mandioca e da mancha bacteriana em tomateiro e pimentão, respectivamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolados de fungos filamentosos utilizados na pesquisa foram disponibilizados pela Profa. Dra. Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro) e foram coletados em diversas regiões da Antártica durante as expedições OPERANTAR XXXII e OPERANTAR XXXIII (2013 e 2015) (Figura 9).

Figura 9 – Locais de coleta dos fungos filamentosos utilizados na pesquisa



(A) Estação brasileira de pesquisa Comandante Ferraz, na Antártica. (B) Ilha Deception, local de coleta de fungos isolados em amostras de solo com biofilme (Whalers Bay) (seta em vermelho), solo abaixo de madeira em decomposição (Ilha Deception) e solo abaixo de barra de ferro (Ilha Deception). (C) Ilha Rei George, local de coleta de fungos isolados em amostras de solo abaixo de gelo, a 4°C (coordenadas 62°05'092''S), e solo alagado, a 1,6°C (coordenadas 57°56'763''W).

No total, foram utilizados 156 fungos, isolados de diferentes amostras de solo e sedimentos marinhos (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação de locais de coleta e substrato dos isolados utilizados na pesquisa.

Número de isolados	Local e substrato de coleta
45	Antártica (vários locais) - Sedimentos marinhos
17	Antártica, Ilha Deception (Pendulum Cove) - Solo abaixo de madeira podre
17	Antártica, Ilha Deception (Pendulum Cove) - Solo abaixo de barra de ferro
31	Antártica, Ilha Deception (Whalers Bay) – Solo com biofilme
30	Antártica, Ilha Rei George – Solo alagado
16	Antártica, Ilha Rei George – Solo abaixo de gelo
156	Total

Todos os isolados fazem parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) e encontram-se preservados em *ultrafreezer* a - 80 °C. A reativação ocorreu em placas de Petri com meio de cultura Malte (2%) – Ágar (1,5%) (MA). As placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D a 15 °C por um período de 10 a 15 dias. Alguns fungos foram fotografados quando em cultivo. As imagens podem ser vistas no Anexo I. As colônias passaram por repique por estriamento em novas placas, a fim de verificar-se a pureza das mesmas. Isolados livres de contaminação foram preservadas pelo método Castellani (CASTELLANI, 1939).

Os isolados de sedimentos marinhos tiveram seus gêneros taxonômicos identificados e estão elencados na Tabela 3.

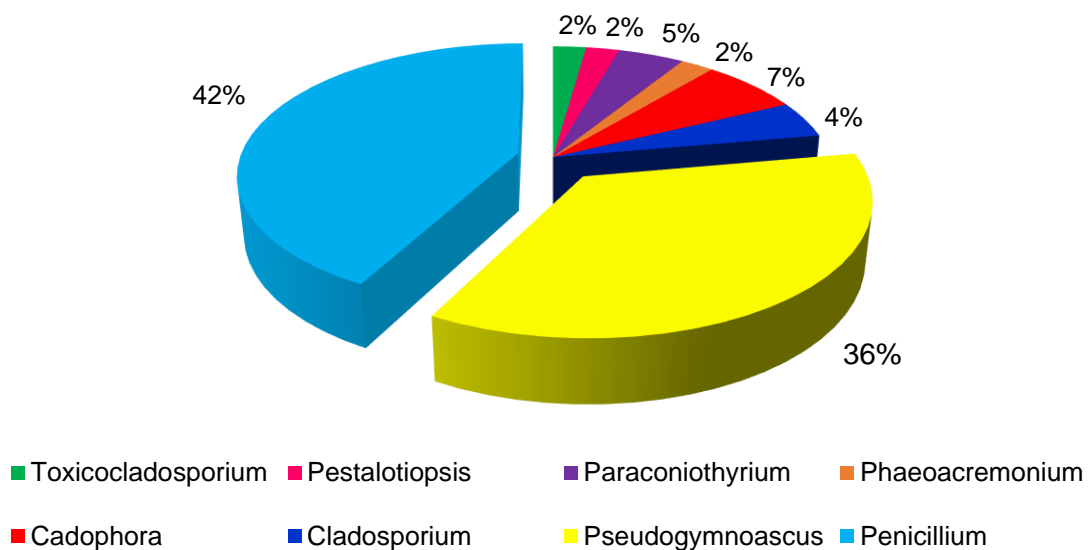
Tabela 3 - Relação de gêneros taxonômicos dos 45 fungos coletados em sedimentos marinhos, na Antártica, utilizados nos bioensaios.

Código do Isolado	Gênero	Código do Isolado	Gênero
3A-1C215IIIC	<i>Cadophora</i>	4DC615I	<i>Penicillium</i>
3A-1C315IIII	<i>Cadophora</i>	5A-1C515II	<i>Penicillium</i>
3A-1C4III	<i>Cadophora</i>	6DC715I	<i>Penicillium</i>
3D-3C1II	<i>Cladosporium</i>	6D-3C1III	<i>Pestalotiopsis</i>
4D-3C1II	<i>Cladosporium</i>	4D-3C115I	<i>Phaeoacremonium</i>
5A-1C115II	<i>Paraconiothyrium</i>	2A-1C1III	<i>Pseudogymnoascus</i>
5DC115I	<i>Paraconiothyrium</i>	2B-1C115IIII	<i>Pseudogymnoascus</i>

2A-1C115II	<i>Penicillium</i>	2D-3C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>
2B-1C115II	<i>Penicillium</i>	2D-3C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>
2D-3C115II	<i>Penicillium</i>	2DC1II	<i>Pseudogymnoascus</i>
2DC415III	<i>Penicillium</i>	2DC615IA	<i>Pseudogymnoascus</i>
2DC715III	<i>Penicillium</i>	2DC615IB	<i>Pseudogymnoascus</i>
3A-1C215IIIP	<i>Penicillium</i>	4A-1C615III	<i>Pseudogymnoascus</i>
3D-3C615I	<i>Penicillium</i>	5DC1III	<i>Pseudogymnoascus</i>
3DC615I	<i>Penicillium</i>	6DC1I	<i>Pseudogymnoascus</i>
4A-1C315III	<i>Penicillium</i>	6DC215III	<i>Pseudogymnoascus</i>
4A-1C115III	<i>Penicillium</i>	5A-1C315III	<i>Pseudogymnoascus</i>
4B-1C1II	<i>Penicillium</i>	6DC315IA	<i>Pseudogymnoascus</i>
4D-3C115III	<i>Penicillium</i>	6DC4I	<i>Pseudogymnoascus</i>
4DC115II	<i>Penicillium</i>	6DC4III	<i>Pseudogymnoascus</i>
5B-1C315IIIA	<i>Penicillium</i>	5A-1C715III	<i>Pseudogymnoascus</i>
5DC815I	<i>Penicillium</i>	5D-3C115II	<i>Toxicocladosporium</i>
4DC515I	<i>Penicillium</i>		

Verifica-se a predominância dos gêneros *Penicillium* e *Pseudogymnoascus* que, juntos, somam 36 dos 45 isolados, representando 78% do total (Figura 10).

Figura 10 - Distribuição percentual de gêneros taxonômicos dos 45 fungos isolados de sedimentos marinhos, na Antártica, utilizados nos bioensaios.

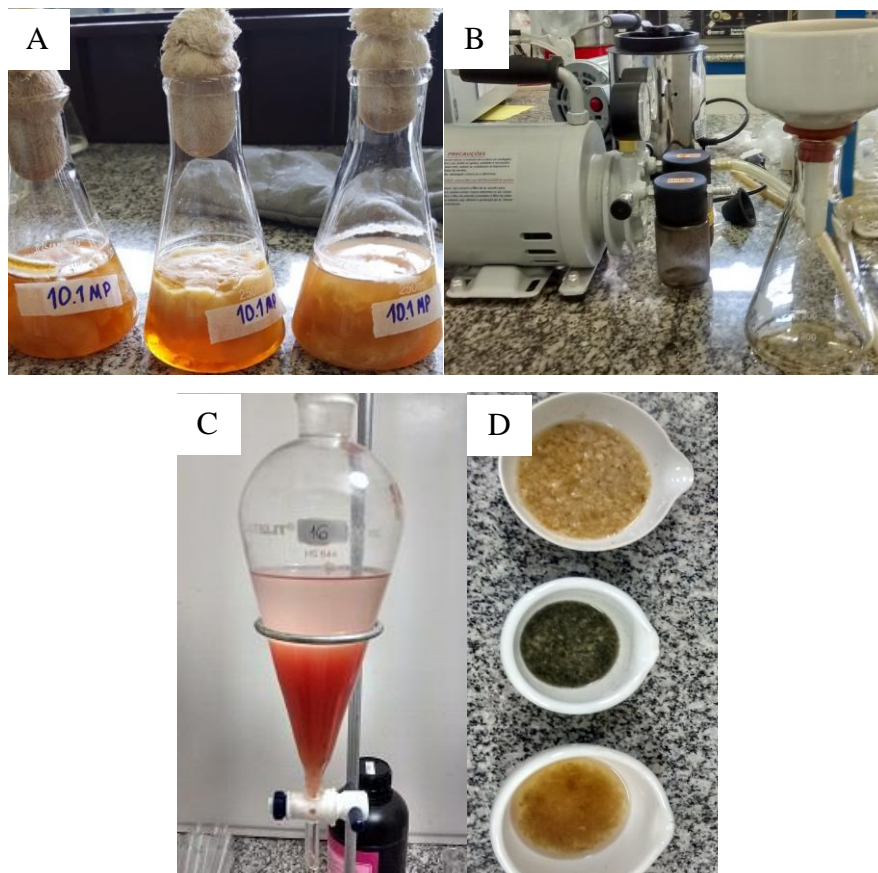


Fonte: elaborado pela autora.

Após o desenvolvimento das colônias, 10 fragmentos de aproximadamente 3x3mm, contendo ágar e micélio, foram transferidos para erlenmeyers, contendo 150mL de meio Malte 2% (líquido) esterilizado, e levados para agitação a 15°C e 150rpm pelo período de 21 dias. Em seguida, foi realizada a separação da biomassa fúngica (contendo os metabólitos intracelulares) do sobrenadante, constituído de meio e outros compostos produzidos pelos fungos, incluindo aí os metabólitos extracelulares.

A separação ocorreu por meio de filtração a vácuo e posterior centrifugação. A extração dos metabólitos intracelulares foi realizada através de maceração da biomassa com metanol como solvente, sendo a fase orgânica, contendo os metabólitos de interesse, submetida à centrifugação para eliminação de partículas celulares possivelmente presentes. O sobrenadante foi separado para evaporação do solvente e as partículas insolúveis foram descartadas após tratamento. Os metabólitos extracelulares presentes no sobrenadante foram extraídos com o solvente orgânico acetato de etila em funil de separação, através de um processo de separação líquido-líquido. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica, contendo os metabólitos, foi levada para evaporação do solvente (Figura 11).

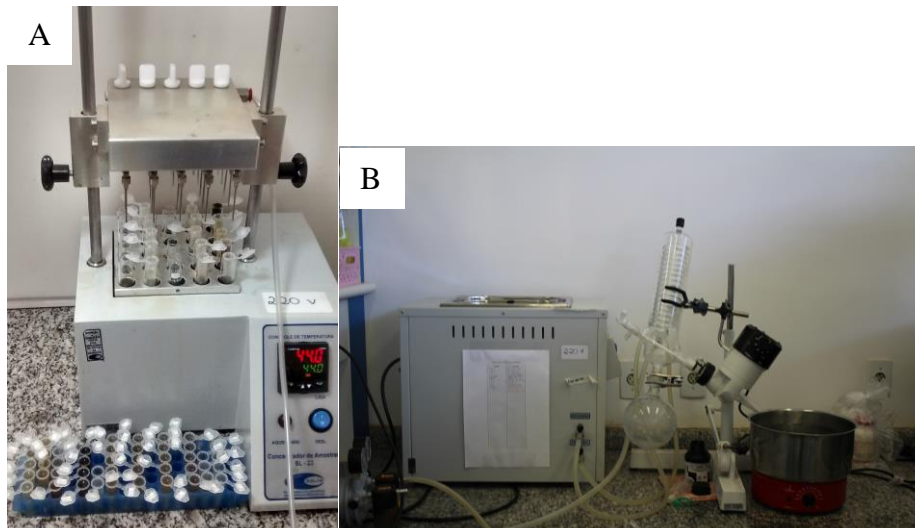
Figura 11 - Processo de extração dos metabólitos



(A) Erlenmeyers após agitação por 21 dias. (B) Filtração a vácuo. (C) Extração líquido-líquido dos extratos extracelulares. (D) Biomassa em metanol durante extração dos extratos intracelulares.

Utilizando-se evaporador rotativo e concentrador de amostras (Figura 12A) com pressão de ar a 40°C, todos os extratos foram concentrados e estocados, já secos, em geladeira a 4°C. Os solventes recuperados no processo de rota-evaporação foram levados para destilação e colocados para reuso. Os extratos secos tiveram sua massa determinada e foram dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% até atingir a concentração final de 30mg/mL. Os extratos diluídos foram armazenados em congelador a -4°C.

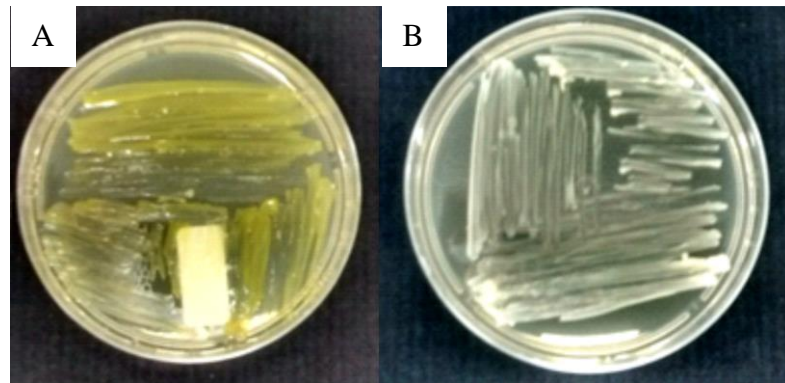
Figura 12 - Processo de concentração das amostras



(A) Concentrador de amostras. (B) Evaporador rotativo utilizado na evaporação dos solventes.

Tanto a *X. euvesicatoria* (isolado IBSBF1387) quanto a *X. ax. pv. manihotis* (isolado IBSBF1994) foram disponibilizadas pela professora Maria Lucia Carneiro Vieira, do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo. As linhagens foram estocadas em tubos de criogenia contendo uma mistura 1:1 de glicerol 80% e meio NYG (constituído por glicerol 2,0%, extrato de levedura 0,3% e peptona bacteriana 0,5%), e acondicionadas em *ultrafreezer* a -80°C. O plaqueamento foi realizado em meio NYG acrescido de 1,5% de ágar com incubação de dois dias em BOD a 29°C (Figura 13).

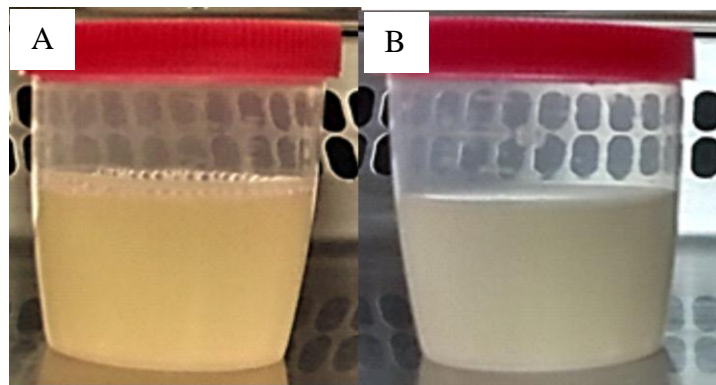
Figura 13 - Placas contendo colônias de *Xanthomonas* após incubação a 29°C por 48 horas.



(A) *Xae* (B) *Xam*

O inóculo bacteriano utilizado nos bioensaios foi preparado a partir de uma alçada de bactérias transferidas para frasco coletor estéril contendo de 20 a 30mL de meio líquido NYG. O frasco coletor foi incubado a 200rpm e 29 °C até atingir densidade óptica $D.O_{600} = 0,8$ (Figura 14).

Figura 14 – Inóculos bacterianos



(A) *X. euvesicatoria* (B) *X. ax. pv. manihotis*. Os inóculos contendo *X. euvesicatoria* apresentam aparência turva e amarelada, enquanto que os de *X. ax. pv. manihotis* apresentam coloração esbranquiçada e opaca.

4.1 Bioensaios

Os extratos contendo metabólitos secundários dos fungos filamentosos antárticos foram submetidos a triagens para avaliação da atividade antibacteriana contra *X. euvesicatoria* e *X. ax. pv. manihotis* seguindo o método REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate), descrito por Palomino et al (2002) e Ferreira (2013), com alterações. Nesse ensaio, o corante azul resazurina é reduzido para a substância resorufina, de coloração rosa, devido à presença de metabolismo

bacteriano. Assim, após a aplicação da resazurina, espera-se a ocorrência de tonalidades azuis e cor de rosa, indicando ausência (respondendo por um resultado positivo no sentido de ação antimicrobiana) ou presença de células bacterianas em desenvolvimento (resultado negativo), respectivamente (Figura 15).

O composto resorufina é altamente fluorescente, permitindo também a medição da atividade bacteriana por meio de um espectrômetro de fluorescência (Figuras 16 e 17).

Figura 15 - Placas de 96 poços utilizadas nos bioensaios após a adição do corante resazurina



Figura 16 – Aplicação do corante resazurina



Figura 17 - Leitura em espectrofotômetro de fluorescência Biotek Synergy H1MFD (comprimento de onda de excitação: 530 nm; comprimento de onda de emissão: 590 nm)



Os bioensaios foram realizados em triplicatas, em microplacas de 96 poços, nas quais foram testados os extratos, controle positivo (CP), controle de veículo (CV) e controle negativo (CN).

Os extratos já dissolvidos em DMSO 10% (C=30mg/mL) foram diluídos em meio NYG até atingir concentração inicial de 2,1mg/mL. Para as triagens iniciais, foram feitas 3 diluições, de modo que as amostras passaram por testes nas concentrações C1= 2,1mg/mL; C2= 1,05mg/mL; C3= 0,525mg/mL; C4= 0,263mg/mL (Figura 18).

Figura 18 - Esquema de montagem das placas para as triagens

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	CP	CN	
B		C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	CP	CN	
C		C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	CP	CN	
D		C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	CP	CN	
E		C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	CV	CN	
F		C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	CV	CN	
G		C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	CV	CN	
H		C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	CV	CN	

C1 é a concentração inicial de 2,1mg/mL e C2 a C4 são microdiluições seriadas. CP é o antibiótico canamicina, CV é o solvente DMSO a 1% e CN o controle negativo.

A partir de uma concentração estoque a 20mg/mL de canamicina (antibiótico), foi realizada uma diluição 1:100 (K1) e 10µL de K1 foram pipetados em 990µL de água destilada (K2; C=200µg/mL). 50µL de K2 foram pipetados em 450µL de meio NYG. A concentração final obtida é 20µg/mL, correspondendo ao MIC 90 da canamicina. O Controle do Veículo (CV) corresponde ao solvente utilizado, o DMSO, e objetiva a confirmar a neutralidade do mesmo no ensaio. Foram pipetados 5µL de DMSO 100% em 495µL de meio NYG, de forma a obter uma concentração de DMSO 1%. O controle negativo foi preparado em 90 µL de meio NYG e 10 µL do inóculo bacteriano de interesse. Após atingir a D.O.600 desejada, o inóculo foi diluído 1:10 em meio NYG e 10µL foram adicionados nos poços da placa, exceto nas colunas 1 e 12, tendo, assim, padronizado que a concentração de células por poço é de 10⁵ UFC. Em seguida, a microplaca foi incubada a 29°C por 18h

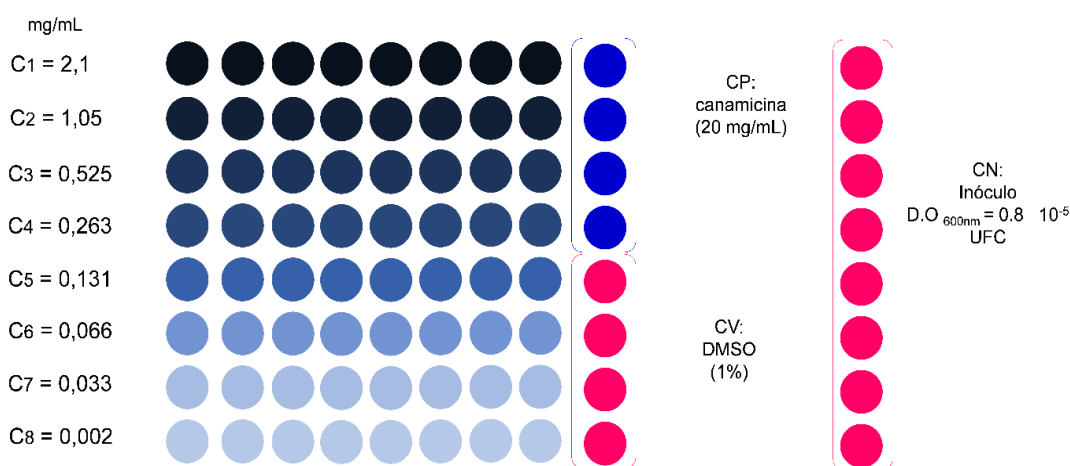
Após o período de incubação, foram adicionados 15µL de rezasurina solução 0,01% (w/v) e a microplaca foi novamente levada a BOD a 29°C por 1h e 30min. Após o período de incubação, a fluorescência produzida na redução da rezasurina em resorufina foi mensurada a 530nm (excitação) e 590nm (emissão), usando um espectrômetro de fluorescência.

A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano é definida pela fórmula abaixo, em que UF são as Unidades de Fluorescência:

$$\frac{[(Média UF controle negativo) - (UF extrato teste)]}{(Média UF controle negativo)} \times 100$$

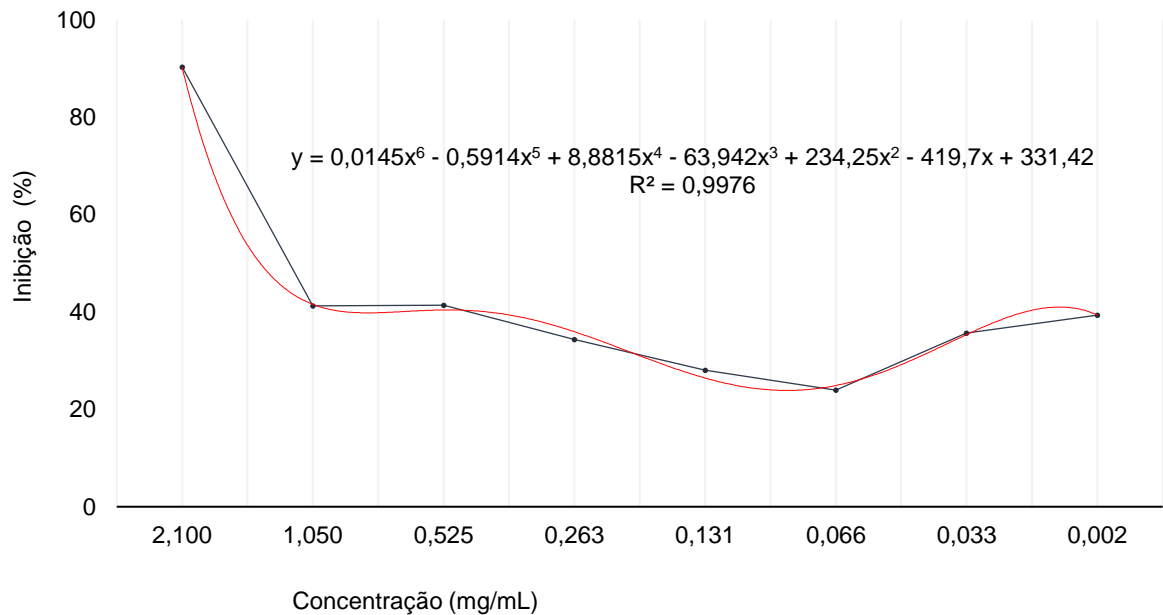
Extratos que apresentaram porcentagem de inibição igual ou superior a 90% foram considerados positivos e, então, reavaliados pelo método REMA completo, cuja diferença da triagem é a adição de mais 4 diluições, de modo que são testadas amostras nas concentrações C1= 2,1mg/mL; C2= 1,05mg/mL; C3= 0,525mg/mL; C4= 0,263mg/mL; C5= 0,131mg/mL; C6= 0,066mg/mL; C7= 0,033mg/mL e C8= 0,002mg/mL (Figura 19).

Figura 19 - Esquema de preparo das placas para os bioensaios completos, com oito concentrações de cada amostra (C1 a C8).



Os dados de porcentagem inibitória obtidos pelo ensaio de viabilidade celular foram utilizados para a construção de curvas de regressão polinomial para cada extrato bioativo. Os valores para MIC90, isso é, a concentração de extrato bruto necessária para a inibição do crescimento de 90% de células bacterianas, foi calculada com base na equação obtida da curva de regressão (Figura 20).

Figura 20 - Exemplo de gráfico com curva de regressão de um extrato e sua respectiva equação polinomial.

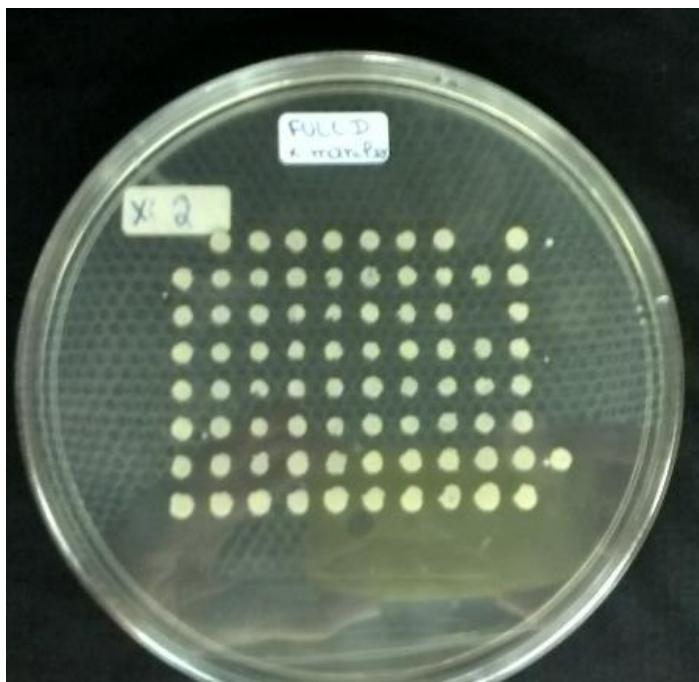


A concentração mínima bactericida foi determinada pela inoculação do conteúdo da microplaca de 96 poços contendo os extratos e a bactéria (após a incubação a 29°C por 18h e antes da adição de resazurina) em placa de Petri (150x15mm) contendo meio Ágar NYG (Figura 21). As placas foram incubadas por 48 horas a 29°C em estufa bacteriológica. O crescimento bacteriano foi analisado visualmente (Figura 22), e extratos em que não houve o crescimento bacteriano foram considerados bactericidas e a MBC foi determinada. Os extratos que apresentaram crescimento bacteriano em todas as concentrações foram considerados bacteriostáticos. O teste foi realizado em triplicatas, em três experimentos independentes, para cada espécie de *Xanthomonas*.

Figura 21 – Tipo de carimbo utilizado para a inoculação na placa de Petri com meio NYG sólido



Figura 22 - Após 48 horas de incubação, as placas são avaliadas visualmente.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, 338 extratos foram testados, sendo 175 intracelulares e 163 extracelulares.

Os resultados estão agrupados de acordo com o substrato e a área de coleta dos fungos, de tal forma que são apresentados os seguintes tópicos:

- a) Sedimentos marinhos (Antártica);
- b) Solo abaixo de madeira podre (Ilha Deception – Pendulum Cove);
- c) Solo abaixo de barra de ferro (Ilha Deception – Pendulum Cove);
- d) Biofilme em solo (Ilha Deception – Whalers Bay);
- e) Solo alagado a 4°C e solo abaixo do gelo a 1,6°C (Ilha Rei George).

Quando comparados os valores para controle positivo (CP) durante os bioensaios contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) e *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xae*), foi observado que, para a primeira espécie, os números tenderam a ficar em torno de 85-93%, ou seja, em muitos casos (cerca de um terço dos ensaios com *Xam*), nem mesmo o antibiótico canamicina atingiu o valor considerado positivo $\geq 90\%$. A média de todos os valores de CP

para *Xam* foi de 90,46%, com alguns chegando a 78%. Em nenhum bioensaio a inibição atingiu 100%. Deve ser considerado o fato de que a *Xam* não apresenta controle químico eficaz em campo para tratamento da bacteriose da mandioca, além de ter rápida propagação e alta virulência, indicando ser de difícil combate. Assim, não é de se espantar que os valores de CP tenham sido consideravelmente baixos em alguns casos. Por outro lado, os valores de CP para os bioensaios contra *Xae* mantiveram-se, em sua maioria, acima dos 90%, com média inibitória de 98,96%, chegando algumas vezes a 100%.

Alguns fungos foram fotografados quando cultivados em placa de *Petri* contendo meio malte-ágar (MA 2%). Essas imagens são encontradas no Anexo 1.

5.1 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica

Nos bioensaios de atividade antibacteriana diante das bactérias, foram testados extratos contendo metabólitos secundários produzidos por 45 fungos filamentosos isolados de amostras de sedimentos marinhos em diversas regiões da Antártica (Tabela 4). Nos testes contra *Xae* foram utilizados 19 extratos no total (17 intracelulares e 2 extracelulares), enquanto que, para *Xam*, foram 61 no total (40 intracelulares e 21 extracelulares).

Tabela 4 - Resultados das triagens para todos os extratos de fungos isolados em sedimentos marinhos, Antártica.

Código do Isolado	<i>Xae</i>		<i>Xam</i>	
	Extra	Intra	Extra	Intra
2A-1C115II	(/)	(/)	(+)	(-)
2B-1C115III	(/)	(/)	(+)	(-)
5A-1C315III	(/)	(-)	(+)	(-)
5A-1C715III	(/)	(-)	(+)	(-)
5D-3C115II	(/)	(-)	(+)	(-)
6D-3C1III	(+)	(-)	(+)	(-)
6DC1I	(+)	(-)	(+)	(-)
4DC615I	(/)	(+)	(-)	(-)
5DC115I	(/)	(+)	(/)	(-)
2D-3C115II	(/)	(-)	(/)	(-)
2D-3C115III	(/)	(/)	(/)	(-)
2DC1II	(/)	(-)	(/)	(-)
2DC415III	(/)	(/)	(/)	(-)
2DC615IA	(/)	(/)	(/)	(-)

2DC615IB	(/)	(-)	(/)	(-)
3A-1C215IIIP	(/)	(/)	(/)	(-)
3A-1C315IIII	(/)	(/)	(/)	(-)
3A-1C4III	(/)	(/)	(/)	(-)
3D-3C1II	(/)	(-)	(/)	(-)
2DC715III	(/)	(/)	(-)	(-)
3D-3C615I	(/)	(/)	(-)	(-)
4A-1C115IIII	(/)	(/)	(-)	(-)
4A-1C315IIII	(/)	(/)	(-)	(-)
4A-1C615III	(/)	(/)	(-)	(-)
2A-1C1III	(/)	(/)	(/)	(-)
5B-1C315IIIIA	(/)	(-)	(-)	(-)
6DC4I	(/)	(/)	(-)	(-)
4B-1C1II	(/)	(/)	(/)	(-)
4D-3C115I	(/)	(-)	(/)	(-)
4D-3C115IIII	(/)	(-)	(/)	(-)
4D-3C1II	(/)	(-)	(/)	(-)
5A-1C115II	(/)	(/)	(/)	(-)
5A-1C515II	(/)	(/)	(/)	(-)
2B-1C115II	(/)	(/)	(/)	(-)
5DC815I	(/)	(-)	(/)	(-)
6DC215IIII	(/)	(/)	(/)	(-)
6DC315IA	(/)	(/)	(/)	(-)
6DC4III	(/)	(/)	(/)	(-)
6DC715I	(/)	(-)	(/)	(-)
2D-3C115IIII	(/)	(/)	(-)	(/)
3A-1C215IIIIIC	(/)	(/)	(-)	(/)
3DC615I	(/)	(/)	(-)	(/)
4DC115II	(/)	(/)	(-)	(/)
4DC515I	(/)	(/)	(-)	(/)
5DC1IIII	(/)	(/)	(-)	(/)

Xae = *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xam* = *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. (+) Positivo; (-) Negativo; (/) Não testado. Intra = Extrato Intracelular; Extra = Extrato extracelular. São considerados positivos aqueles extratos cuja porcentagem de inibição bacteriana foi igual ou superior a 90. A concentração dos extratos é de 2,1mg/mL.

Os 9 isolados de sedimentos marinhos cujos extratos apresentaram bioatividade contra uma ou ambas as espécies de *Xanthomonas* são pertencentes a 5 diferentes gêneros taxonômicos, sendo a maioria do gênero *Pseudogymnoascus* (Tabela 5).

Tabela 5 - Gênero dos isolados de sedimentos marinhos cujos extratos foram bioativos contra uma ou ambas as espécies de *Xanthomonas*. Os dados são para concentração inicial, ou seja, 2,1mg/mL.

Código do Isolado	Gênero taxonômico	<i>Xae</i>		<i>Xam</i>	
		Extra	Intra	Extra	Intra
2A-1C115II	<i>Penicillium</i>	(/)	(/)	(+)	(-)
4DC615I	<i>Penicillium</i>	(/)	(+)	(-)	(-)
2B-1C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>	(/)	(/)	(+)	(-)
5A-1C315III	<i>Pseudogymnoascus</i>	(/)	(-)	(+)	(-)
5A-1C715III	<i>Pseudogymnoascus</i>	(/)	(-)	(+)	(-)
6DC1I	<i>Pseudogymnoascus</i>	(+)	(-)	(+)	(-)
5DC115I	<i>Paraconiothyrium</i>	(/)	(+)	(/)	(-)
6D-3C1III	<i>Pestalotiopsis</i>	(+)	(-)	(+)	(-)
5D-3C115II	<i>Toxicocladosporium</i>	(/)	(-)	(+)	(-)

Percebe-se a predominância de isolados do gênero *Pseudogymnoascus* tanto nos resultados positivos quanto no total dos fungos utilizados na pesquisa. De fato, este gênero é extremamente comum na Antártica (SANTIAGO et al, 2015, GODINHO et al, 2015; DING et al.; 2016). Isolados de *Pseudogymnoascus* em associação com esponjas antárticas foram relatados como apresentando compostos capazes de inibir *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas campestris* (HENRÍQUEZ et al, 2014). Outros, em associação a macroalgas endêmicas da região, mostraram atividade inibitória contra *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cladosporium sphaerosperum* (FURBINO et al, 2015).

5.2 Resultados dos bioensaios contra *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xae*).

Dos 17 extratos intracelulares testados contra *Xae*, 2 foram considerados positivos, ou seja, atingiram 90% ou mais de inibição bacteriana. Esses extratos foram produzidos pelos isolados 4DC615I, pertencentes ao gênero *Penicillium*, e 5DC115I, do gênero *Paraconiothyrium*, e o percentual inibitório nos bioensaios completos foi de 94,37% e 97,23%, respectivamente, à concentração de 2,1 (mg/mL) (Figura 23). Para a última diluição, de 0,002mg/mL, o extrato 5DC115I mostrou inibição de 53,87% \pm 7,8, ao passo que 4DC615I inibiu 10,98% \pm 5,35. Os valores de desvio padrão para o extrato 4DC615I foram relativamente mais altos quando comparados com 5DC115I. Nota-se que ambos apresentaram similaridades no decaimento da relação dose-resposta, o que é condizente com o esperado, ou seja, com o decair da concentração, a inibição diminui proporcionalmente. Dois extratos extracelulares (isolados 6DC1I e 6D-3C1III) foram testados contra *Xae*, ambos positivos para inibição bacteriana (Figura 24).

Figura 23 - Relação dose-resposta dos extratos intracelulares produzidos pelos isolados 5DC115I e 4DC615I contra *Xanthomonas euvesicatoria*.

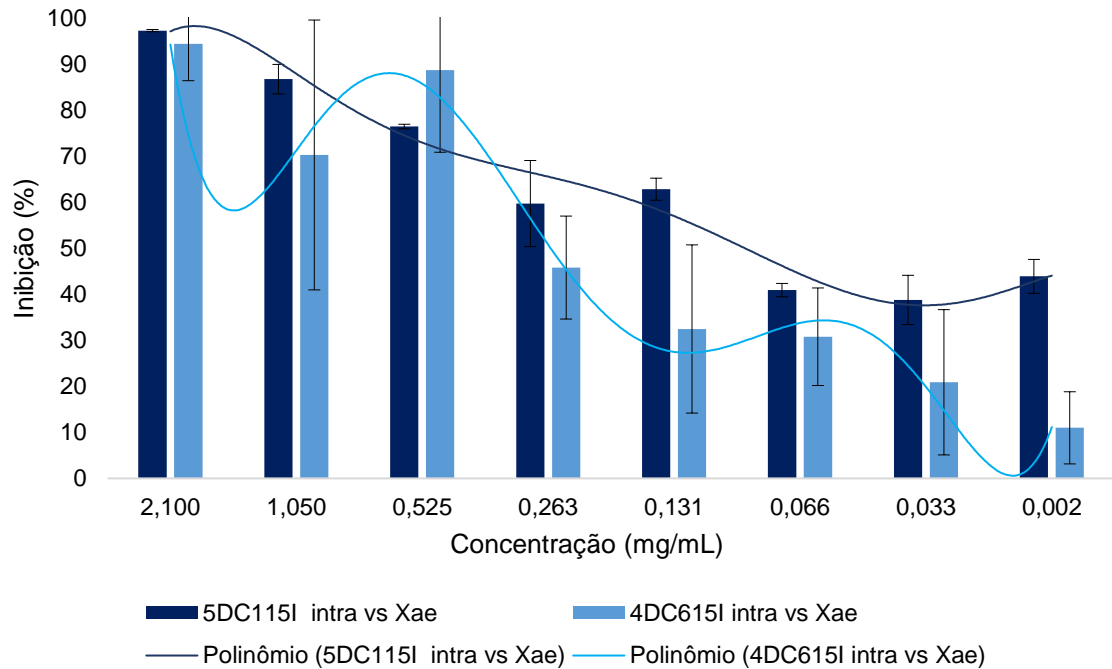
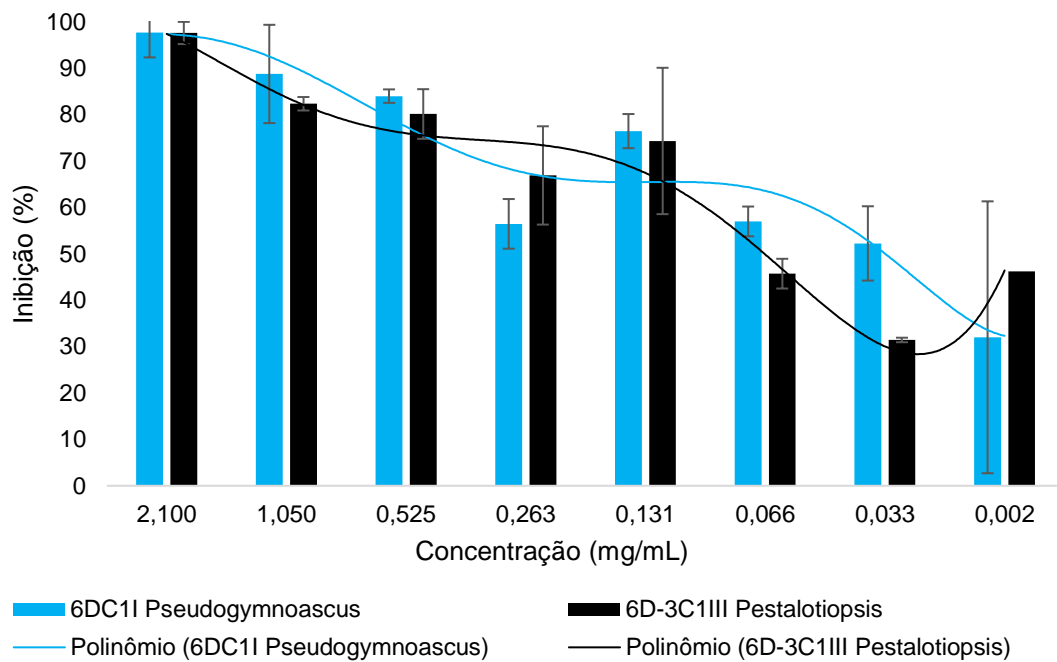


Figura 24 - Relação dose-resposta dos extratos extracelulares produzidos pelos isolados 6DC1I e 6D-3C1III contra *Xae*.



Ambos extratos mostraram ação inibitória à concentração máxima (2,1mg/mL) muito próximas, em torno de 97%. Assim como os extratos intracelulares mostrados na figura 23, estes também mostraram valores de decaimento da resposta em detrimento da dose do extrato

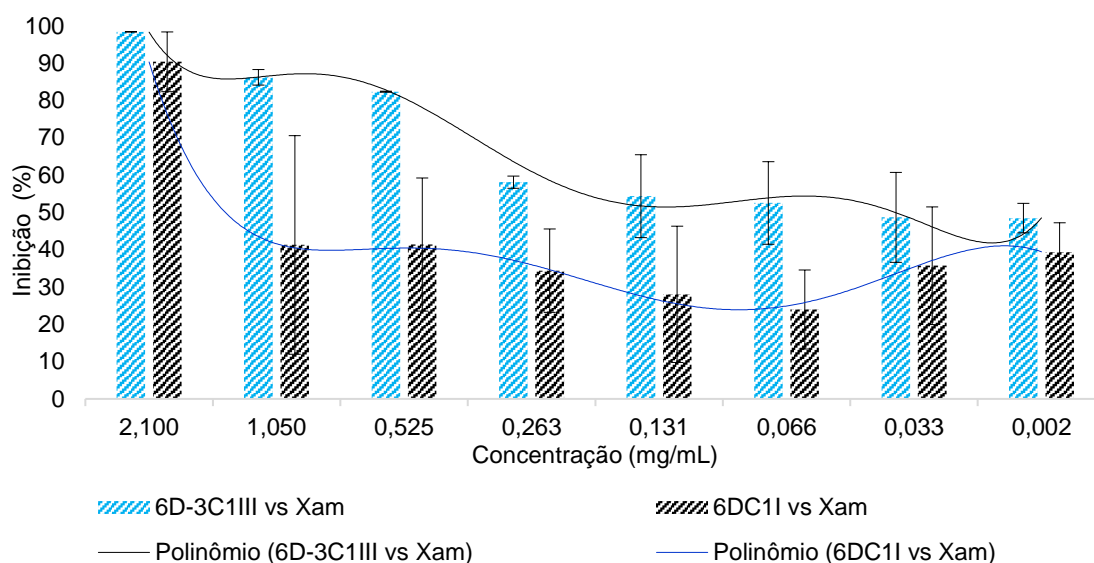
bastante favoráveis, sendo que quando as concentrações caíram pela metade, a inibição bacteriana também atingiu 50% ou mais.

5.3 Resultados dos bioensaios contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam)

Foram testados 40 extratos intracelulares metabolizados por fungos de sedimentos marinhos em bioensaios contra Xam. Ainda que nenhum tenha resultado em inibição bacteriana $\geq 90\%$, algumas amostras atingiram valores relativamente altos. É o caso dos extratos 5A-1C115II e 5A-1C515II, ambos com 85% ($\pm 3,76$) de inibição bacteriana. Como já colocado anteriormente, o antibiótico canamicina, utilizado como controle positivo, também não atingiu 90% de inibição em parte dos testes. Assim, os resultados alcançados pelos extratos em questão ainda merecem consideração. Contudo, a fim de manter a padronização dos resultados, foram feitos estudos detalhados de ação apenas para aqueles extratos cuja inibição bacteriana foi igual ou maior que 90%.

Foram utilizados 21 extratos extracelulares produzidos por fungos de sedimentos marinhos nos bioensaios contra Xam, sendo que 7 deles retornaram resultados positivos. Os extratos extracelulares produzidos pelos isolados 6DC1I e 6D-3C1III foram ativos tanto contra *Xae* (Figura 24) como também contra *Xam* (Figura 25), com 90% e 98% de inibição, respectivamente, a 2,1mg/mL.

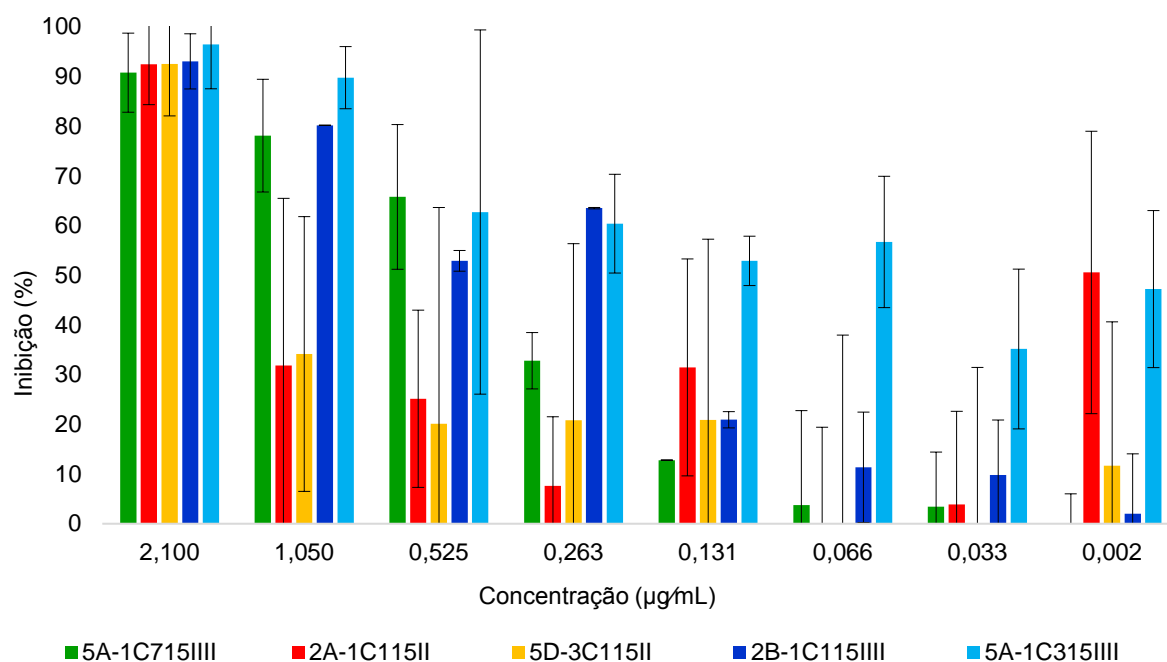
Figura 25 - Relação dose-resposta dos extratos extracelulares produzidos pelos isolados 6DC1I e 6D-3C1III contra *Xam*



O extrato extracelular produzido pelo isolado 6D-3C1III atingiu o maior valor inibitório, e sua ação antibacteriana continuou ocorrendo em altas porcentagens, inclusive à concentração final de 0,002mg/mL, na qual atingiu $48\% \pm 1,45$ no ensaio contra *Xam* e $32,01\% \pm 29,30$ contra *Xae*. Todos mantiveram valores consideráveis de inibição, ainda que a concentração de 0,131mg/mL.

As relações dose-resposta dos demais extratos extracelulares bioativos para *Xam* estão apresentadas na figura 26. O menor valor inibitório foi obtido pelo extrato 5A-1C715III, com 90%, seguido por 2A-1C115II e 5D-3C115II, ambos com 92% de inibição bacteriana. Os extratos produzidos pelos isolados 2B-1C115III e 5A-1C315III apresentaram inibição de 93% e 96% respectivamente.

Figura 26 - Relação dose-resposta dos extratos extracelulares produzidos pelos isolados 5A-1C715III, 2A-1C115II, 5D-3C115II, 2B-1C115III e 5A-1C315III nos ensaios contra *Xam*.



Percebe-se que os extratos extracelulares 5D-3C115II, produzido pelo isolado do gênero *Toxicocladosporium*, e 2A-1C115II, produzido pelo isolado do gênero *Penicillium*, apresentaram curvas muito semelhantes de ação, entretanto ambos tiveram decaimento brusco na ação conforme a diluição. Quando a concentração caiu de 2,1 para a metade, 1,050 mg/mL, a ação inibitória decaiu de 92% para 35%.

O extrato 5A-1C315III, em especial, atingiu picos bastante altos de inibição. Esse extrato se destaca dos demais por ter em consideração o fato de que o CP para *Xam* é abaixo do poder inibitório do mesmo, de maneira geral.

Além dos resultados acima apresentados, alguns destes extratos também passaram por testes previamente realizados por Vieira et al. (2018) e Purić et al. (2018) contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, que causa a mancha bacteriana do maracujazeiro, e *X. citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico em laranja. A comparação dos resultados, mostrados na tabela 6, indica que alguns extratos apresentam bioatividade para mais de uma espécie de *Xanthomonas*, senão para todas as avaliadas.

Tabela 6 - Comparação de bioatividade dos extratos de sedimentos marinhos contra outras espécies de *Xanthomonas*.

Tipo de extrato e código do isolado	Gênero taxonômico	Inibição bacteriana <i>Xae</i>	Inibição bacteriana <i>Xam</i>	Inibição bacteriana <i>Xap</i>	Inibição bacteriana <i>Xac</i>
Ex 6D-3C1III	<i>Pestalotiopsis</i>	(+)	(+)	(-)*	(-)*

Ex 6DC1I	<i>Pseudogymnoascus</i>	(+)	(+)	(-)*	(-)*
Ex 5A-1C715III	<i>Pseudogymnoascus</i>	(+)*	(+)	(+)*	(+)*
Ex 5A-1C315III	<i>Pseudogymnoascus</i>	(+)*	(+)	(+)*	(+)*
Ex 2B-1C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>	(+)*	(+)	(+)*	(+)*
Ex 2A-1C115II	<i>Penicillium</i>	(+)*	(+)	(+)*	(+)*
Ex 5D-3C115II	<i>Toxicocladosporium</i>	(+)*	(+)	(+)*	(+)*

In = Intracelular; *Ex* = extracelular (+) indica os extratos cuja bioatividade foi $\geq 90\%$ e (-) indica os extratos cuja bioatividade foi $\leq 90\%$. A concentração é de 2,1 mg/mL. * Indica os extratos cujos resultados foram extraídos de Vieira et al., 2018 e Puric et al., 2018. *Xae* = *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xam* = *X. ax. pv. manihotis*; *Xap* = *X. axonopodis pv. passiflorae*; *Xac* = *X. citri subsp. citri*.

Todos os extratos que apresentaram bioatividade contra mais de uma espécie de *Xanthomonas* são de origem extracelular. Cinco deles foram bioativos para todas as espécies, sendo que, desses cinco, três foram produzidos por diferentes isolados do gênero *Pseudogymnoascus* ssp., e os outros dois, por isolados dos gêneros *Pestalotiopsis* ssp. e *Toxicocladosporium* ssp. Dois extratos extracelulares (6D-3C1III e 6DC1I) apresentaram bioatividade contra *Xae* e *Xam* apenas.

Os extratos intracelulares produzidos pelos fungos 5DC115I e 4DC615I apresentaram bioatividade apenas contra *X. euvesicatoria*.

5.4 Concentração Mínima Inibitória (MIC 90)

A concentração mínima necessária para cada que extrato atinja inibição de 90% das células bacterianas (MIC 90) foi calculada a partir da equação polinomial extraída dos respectivos gráficos dose-resposta. Os resultados para cada extrato estão na tabela 7.

Tabela 7 - Valores de MIC 90 (em mg/mL) e seus respectivos desvios padrão para os extratos de isolados de sedimentos marinhos bioativos contra *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xae*) e *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis* (*Xam*).

Código do Isolado / Origem do Extrato	MIC 90 (<i>Xae</i>) (mg/mL)	MIC 90 (<i>Xam</i>) (mg/mL)
Ex 6D-3C1III	1,982 ± 0,9764	1,171 ± 0,9914
Ex 2A-1C115II	-	1,675 ± 0,9339
Ex 2B-1C115III	-	1,863 ± 0,9182
Ex 5A-1C315III	-	1,982 ± 0,9628
Ex 5A-1C715III	-	2,098 ± 0,9872
In 5DC115I	1,765 ± 0,9941	-

In 4DC615I	2,003 ± 0,9346	-
Ex 6DC1I	2,086 ± 0,9874	1,747 ± 0,9976
Ex 5D-3C115II	-	2,077 ± 0,9128

Ex= Extracelular; In= Intracelular. - indica valores não calculados.

O menor valor de MIC 90 obtido para os testes contra *Xae* foi de 1,765, pelo extrato 5DC115I intracelular. Para *Xam*, esse valor foi de 1,171, pelo extrato 6D-3C1III extracelular, indicando que ambos apresentam um maior potencial para produzir compostos bioativos em menores concentrações.

5.5 Concentração Mínima Bactericida (MBC)

Os extratos bioativos foram submetidos à avaliação da atividade bactericida, sendo que, para as amostras que apresentaram essa atividade, foi determinada a concentração bactericida mínima (MBC). Através da análise visual das placas onde ocorreu a inoculação, após 48 horas, foi possível determinar se o extrato teve caráter bactericida ou bacteriostático. A tabela 8 traz os resultados para ambas as *Xanthomonas*.

Tabela 8 - Resultados da análise de MBC para extratos produzidos por isolados de sedimentos marinhos positivos contra *Xae* e *Xam*.

<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>		
Extrato	Concentração Mínima Bactericida	Caráter Bacteriostático
Ex 6DC1I	1,050	-
In 5DC115I	2,100	-
In 4DC615I	-	2,100
Ex 6D-3C1III	-	2,100
<i>Xanthomonas ax. pv. manihotis</i>		
Extrato	Concentração Mínima Bactericida	Caráter Bacteriostático
Ex 6DC1I	2.100	-
Ex 6D-3C1III	2,100	-
Ex 2A-1C115II	-	2,100
Ex 2B-1C115III	-	2,100

Ex 5A-1C315III	-	2,100
Ex 5A-1C715III	-	2,100
Ex 5D-3C115II	-	2,100

O extrato extracelular 6DC1I foi o único a apresentar caráter bactericida a 1,050mg/mL contra ambas as *Xanthomonas* e MBC de 2,1mg/mL contra *Xam*.

O extrato intracelular 5DC115I apresentou ação bactericida a 2,1mg/mL contra *Xae*, mas o intracelular 4DC615I foi bacteriostático.

O extrato 6D-3C1III extracelular foi bacteriostático contra *Xae* e bactericida a 2,1mg/mL contra *Xam*. Os demais extratos apresentaram caráter bacteriostático.

5.6 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de madeira podre, coletados na Ilha de Deception (Pendulum Cove).

Foram testados 9 extratos extracelulares e 11 extratos intracelulares produzidos por 18 fungos filamentosos isolados de solo abaixo de madeira podre na Ilha Deception, Antártica, contra *Xanthomonas ax. pv. manihotis* (*Xam*) (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados das triagens para todos os extratos de fungos isolados em solo abaixo de madeira podre na Ilha Deception, Antártica testados contra *Xam* e *Xae*.

Código do Isolado	<i>Xam</i>	
	Extra	Intra
10 MP	(+)	(/)
10.5 MP (<i>Pseudogymnoascus sp.</i>)	(+)	(/)
10.2 MP	(-)	(-)
10.1 MP	(-)	(+)
10.8 MP (<i>Pseudogymnoascus sp.</i>)	(-)	(+)
7 MA	(-)	(/)
6 MA	(-)	(/)
3 MA	(-)	(/)
2 MA	(-)	
10.A MP		(-)
10.6 MP	(/)	(-)
9 MP	(/)	(-)
D MP	(/)	(-)
F MP	(/)	(-)

5 MP	(/)	(-)
4 MP	(/)	(-)
CMP	(/)	(+)
<i>(Pseudogymnoascus sp.)</i>		

**Xae* = *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xam* = *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. (+) Positivo; (-) Negativo; (/) Não testado. Intra = Extrato Intracelular; Extra = Extrato extracelular. São considerados positivos aqueles extratos cuja porcentagem de inibição bacteriana foi igual ou superior a 90. A concentração dos extratos é de 2,1mg/mL.

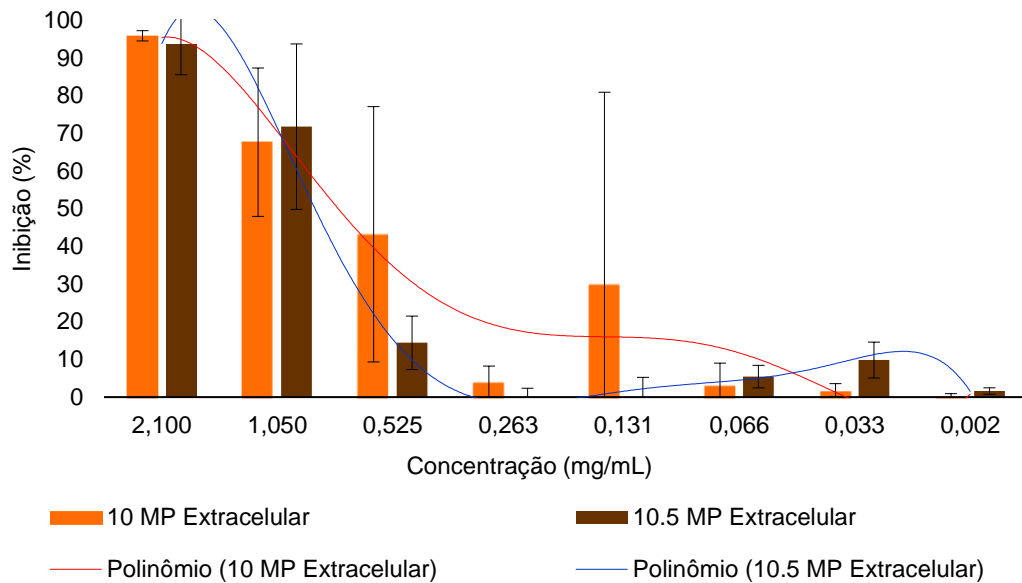
Alguns isolados tiveram os gêneros taxonômicos identificados. Estes encontram-se em parênteses na tabela*.

Dos onze extratos extracelulares testados, três apresentaram bioatividade igual ou superior a 90% de inibição contra *Xam*. O maior valor inibitório atingido para essa espécie bacteriana foi de 98,77%, alcançado pelo extrato intracelular CMP à concentração de 2,1mg/mL. A pesquisa de Vieira et al. (2018) também apresenta resultados para esses mesmos extratos da tabela 9 contra mais duas outras espécies de *Xanthomonas*: *X. ax.* pv. *passiflorae* (*Xap*) e *X. citri* subsp. *citri* (*Xac*). Os extratos intracelulares produzidos pelos isolados CMP, 10.1 MP e 10.8 MP também mostraram bioatividade contra todas as outras espécies.

Dos 9 extratos extracelulares testados, dois resultaram em inibição da *Xam* igual ou acima de 90% (10 MP com 95,85% de inibição e 10.5 MP com 93,68%). Esses extratos foram bioativos apenas contra *Xam*. Todos os fungos bioativos são pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus*.

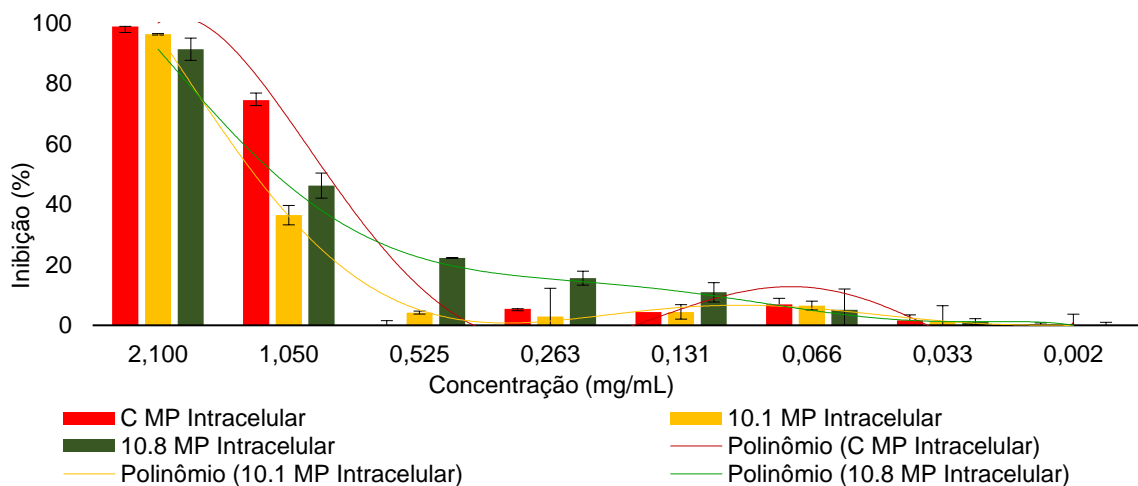
As figuras 27 e 28 contêm as relações dose-resposta dos extratos extracelulares e intracelulares, respectivamente, bioativos contra *Xam*.

Figura 27 - Relação dose-resposta dos extratos extracelulares produzidos por fungos isolados de solo abaixo de madeira podre e bioativos contra *Xam*. Suas respectivas curvas polinomiais estão representadas.



Ambos os extratos apresentaram semelhantes relações entre concentração e bioatividade antibacteriana, com decaimento chegando a uma inibição próxima a zero na quarta concentração (0,263mg/mL). Os valores para desvio padrão foram relativamente altos, porém isso foi também verificado na maioria dos ensaios com *Xam*.

Figura 28 - Relação dose-resposta dos extratos intracelulares produzidos por fungos isolados de solo abaixo de madeira podre e bioativos contra *Xam*.



Todos os extratos intracelulares iniciaram em altas porcentagens inibitórias à primeira concentração, porém, já na terceira diluição, os valores decaíram para próximos a nulo. Os valores de CP mantiveram o padrão observado para esta *Xanthomonas* que, de modo geral,

mantêm-se em torno de 90-91%, chegando algumas vezes a 88-89%. Os valores de desvio padrão não sofreram muitas variações.

5.7 Concentração Mínima Inibitória (MIC 90) e Concentração Mínima Bactericida (MBC)

O extrato 10 MP mostrou inibir 90% de células bacterianas a 0,7115mg/mL, a menor MIC 90 dentre as amostras. A maior concentração necessária para inibir a mesma porcentagem de células foi obtida pelo extrato 10.1 MP, e foi de 1,097mg/mL.

O único extrato que apresentou caráter bacteriostático, ou seja, no qual foi verificada a presença de colônias em crescimento na concentração máxima, foi o extracelular 10 MP. Os demais se mostraram bactericidas a 2,1mg/mL, com exceção do 10.8 MP intracelular, cuja ação bactericida se deu a 1,050mg/mL.

5.8 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception, Antártica.

Foram reativados 17 fungos isolados de solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception, Antártica (Tabela 10), para a produção dos extratos usados em testes de atividade antimicrobiana contra *Xae* e *Xam*. No total, foram testados 17 extratos contra *Xae*, 16 deles extracelulares (dois positivos) e apenas um intracelular, tendo este resultado negativo. Para *Xam*, foram testados 41 extratos, sendo 19 extracelulares e 22 intracelulares. Apenas um extrato, de origem extracelular, apresentou bioatividade acima de 90% contra *Xam*. Nenhum dos extratos foi ativo contra ambas as espécies bacterianas estudadas.

Tabela 10 - Resultados das triagens para os extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception, Antártica, contra *Xae* e *Xam*.

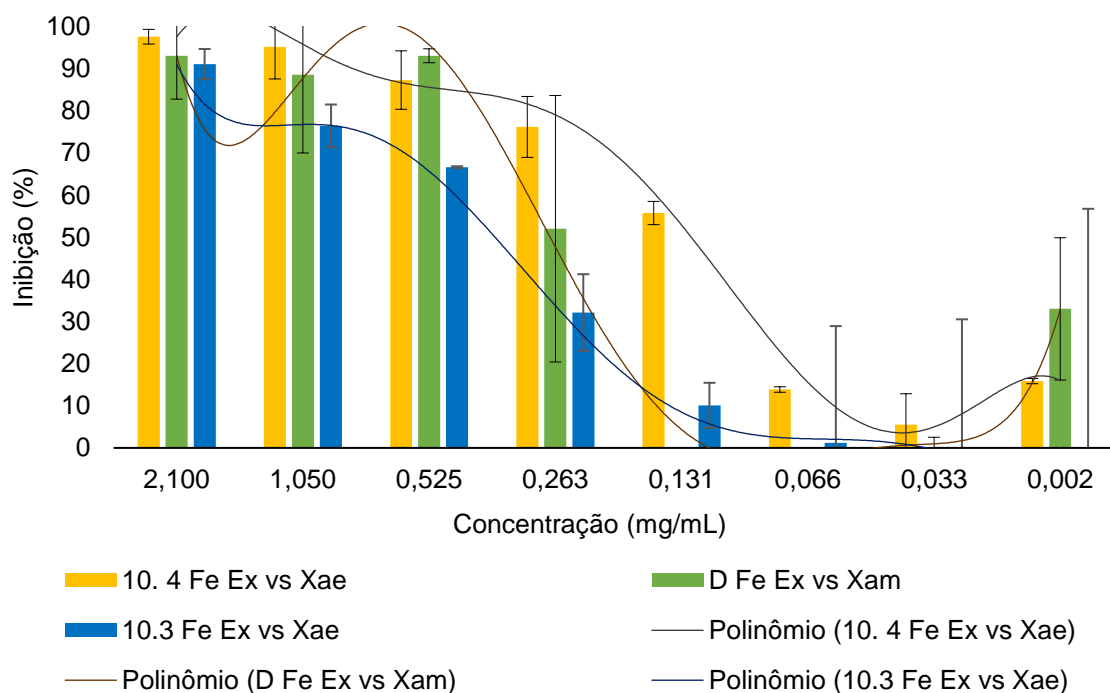
Código do Isolado	<i>Xae</i>		<i>Xam</i>	
	Extra	Intra	Extra	Intra
10.3 FE	(+)	(/)	(-)	(-)
10.4 FE	(+)	(/)	(-)	(-)
D FE	(-)	(/)	(+)	(-)
10.2 FE	(-)	(/)	(-)	(-)
1 FE	(-)	(-)	(-)	(-)
1 FE'	(/)	(/)	(-)	(-)

10.A FE	(/)	(/)	(-)	(-)
11 FE	(-)	(/)	(/)	(-)
12 FE	(-)	(/)	(-)	(-)
2 FE	(/)	(/)	(-)	(-)
2 FE'	(/)	(/)	(-)	(-)
3 FE	(-)	(/)	(/)	(-)
3 FE'	(-)	(/)	(-)	(-)
4 FE	(-)	(/)	(-)	(-)
4 FE'	(/)	(/)	(/)	(-)
5 FE	(-)	(/)	(-)	(/)
6 FE	(-)	(/)	(-)	(/)
6 FE'	(/)	(/)	(/)	(-)
7 FE'	(/)	(/)	(/)	(-)
8 FE	(-)	(/)	(-)	(/)
8 FE'	(/)	(/)	(/)	(-)
A FE	(-)	(/)	(-)	(/)
B FE	(/)	(/)	(/)	(-)
C FE	(-)	(/)	(-)	(-)
10.1 FE	(/)	(/)	(-)	(-)
G FE	(-)	(/)	(-)	(-)

**Xae* = *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xam* = *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. (+) Positivo; (-) Negativo; (/) Não testado. Intra = Extrato Intracelular; Extra = Extrato extracelular. São considerados positivos aqueles extratos cuja porcentagem de inibição bacteriana foi igual ou superior a 90. A concentração dos extratos é de 2,1mg/mL.

Contra *Xae*, os extratos extracelulares produzidos pelo isolados 10.4 Fe e 10.3 Fe inibiram 97% e 91% respectivamente. Contra *Xam*, o extracelular D Fe atingiu 96%. A figura 29 apresenta a relação dose-resposta para os três extratos positivos contra as *Xanthomonas* testadas.

Figura 29 - Relação dose-resposta dos extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception, Antártica.



Observa-se que os três extratos bioativos apresentaram alto desempenho inibitório até a concentração de 0,263mg/mL e todos tiveram decaimento consistente da curva. O extrato 10.4 Fe continuou apresentando inibição de mais de 50% a 0,131mg/mL.

5.9 Concentração Mínima Inibitória (MIC 90) e Concentração Mínima Bactericida (MBC)

O menor valor obtido para MIC 90 contra *Xae* foi de 1,345mg/mL, pelo extrato 10.3 Fe, e o maior foi de 2,123mg/mL (extrato 10.4 Fe). O extrato D Fe, bioativo contra *Xam*, apresentou MIC 90 de 1,165mg/mL.

Nenhum extrato bioativo para *Xae* apresentou caráter bactericida nas concentrações testadas, sendo, portanto, considerados bacteriostáticos. O extrato positivo para *Xam*, entretanto, foi bactericida na concentração de 2,1mg/mL.

5.10 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de biofilme em solo na Ilha Deception (Whalers Bay), Antártica.

Foram utilizados 31 fungos filamentosos provenientes de amostras de solo com biofilme coletadas na Ilha Deception - Whalers Bay. 25 extratos intracelulares e 25 extracelulares foram testados contra *Xae*. Para os bioensaios contra *Xam*, utilizaram-se 10 intracelulares e 22 extracelulares. Os resultados das triagens estão na tabela 11.

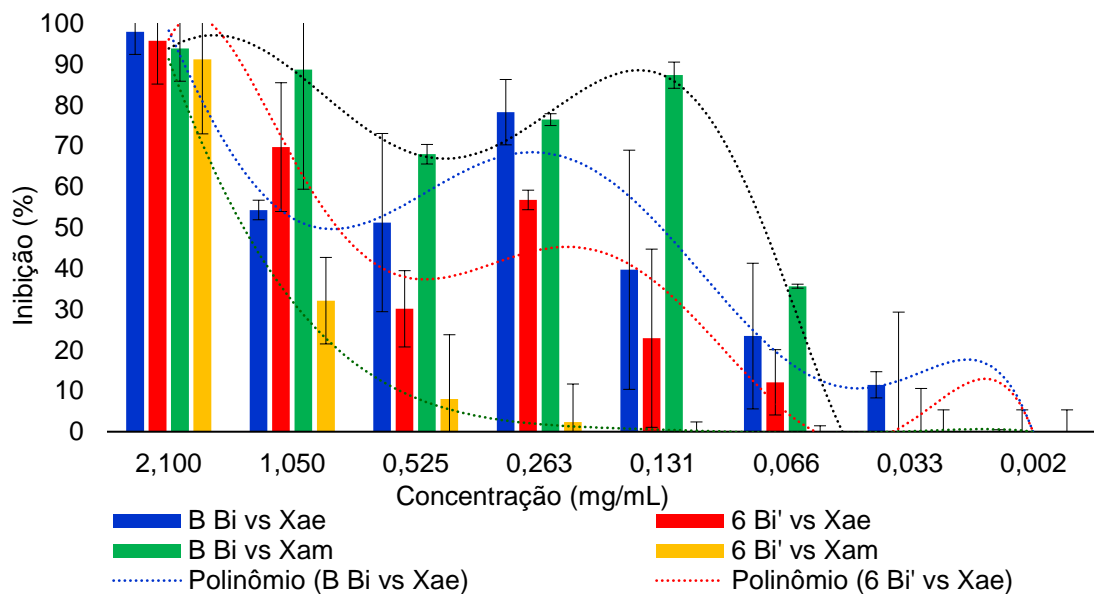
Tabela 11 - Resultados para triagens com extratos de fungos isolados em biofilme de solo na Ilha Deception – Whalers Bay contra *Xae* e *Xam*.

Código do Isolado	<i>Xae</i>		<i>Xam</i>	
	Extra	Intra	Extra	Intra
10.1 WB	(-)	(+)	(-)	(-)
10.1 Bi	(-)	(+)	(-)	(/)
6 Bi'	(-)	(+)	(-)	(+)
B Bi	(-)	(+)	(-)	(+)
A Bi	(-)	(-)	(/)	(+)
7 Bi	(-)	(-)	(/)	(+)
1 Bi	(/)	(-)	(/)	(-)
10.5 Bi	(-)	(-)	(-)	(/)
2 Bi 'c	(-)	(-)	(-)	(/)
3 Bi	(-)	(-)	(-)	(/)
3 Bi 'c	(-)	(/)	(-)	(/)
4 Bi	(/)	(-)	(-)	(/)
4 Bi 'c	(-)	(-)	(-)	(/)
5 Bi	(-)	(/)	(-)	(/)
5 Bi 'c	(/)	(-)	(-)	(/)
6 Bi	(-)	(/)	(/)	(/)
10.1	(-)	(/)	(/)	(/)
10 Bi	(-)	(/)	(-)	(/)
7Bi 'c	(-)	(-)	(-)	(/)
8 Bi	(/)	(-)	(-)	(/)
8 Bi 'c	(-)	(-)	(-)	(/)
9 Bi	(-)	(/)	(-)	(/)
9 Bi 'c	(-)	(-)	(-)	(/)
10.2 Bi	(-)	(-)	(-)	(/)
1 WB	(-)	(-)	(-)	(-)
1WB'	(/)	(-)	(/)	(/)
2 WB	(-)	(-)	(-)	(-)
10.2 WB	(-)	(-)	(/)	(/)
10.4 Bi	(-)	(-)	(/)	(/)
1 WB 'c	(/)	(-)	(-)	(-)
10.3 WB	(-)	(-)	(/)	(-)

**Xae* = *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xam* = *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. (+) Positivo; (-) Negativo; (/) Não testado. Intra = Extrato Intracelular; Extra = Extrato extracelular. São considerados positivos aqueles extratos cuja porcentagem de inibição bacteriana foi igual ou superior a 90. A concentração dos extratos é de 2,1mg/mL.

Apenas extratos intracelulares mostraram ação antimicrobiana tanto para *Xae* quanto para *Xam* e dois deles (6 Bi' e B Bi) foram bioativos para ambas. 6 Bi' apresentou 95,76% de inibição bacteriana de *Xae* e 91,23% para *Xam* a 2,1mg/mL. Já o extrato B Bi, contra *Xae*, apresentou 97,98% de inibição bacteriana e contra *Xam* este valor foi de 93,87%.

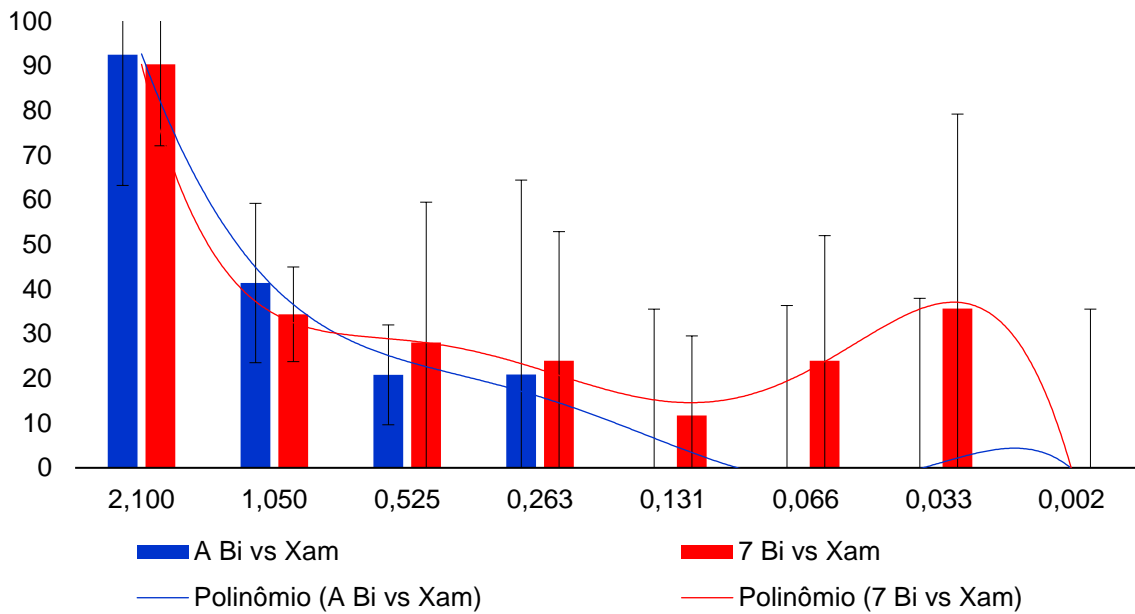
Figura 30 - Relação dose-resposta dos extratos intracelulares 6 Bi' e B Bi contra *Xae* e *Xam*.



Observa-se que o extrato B Bi intracelular apresentou valores inibitórios maiores, nas mesmas concentrações, em comparação com o extrato 6 Bi'. Todos mostraram decaimento consistente com o esperado na relação dose-resposta.

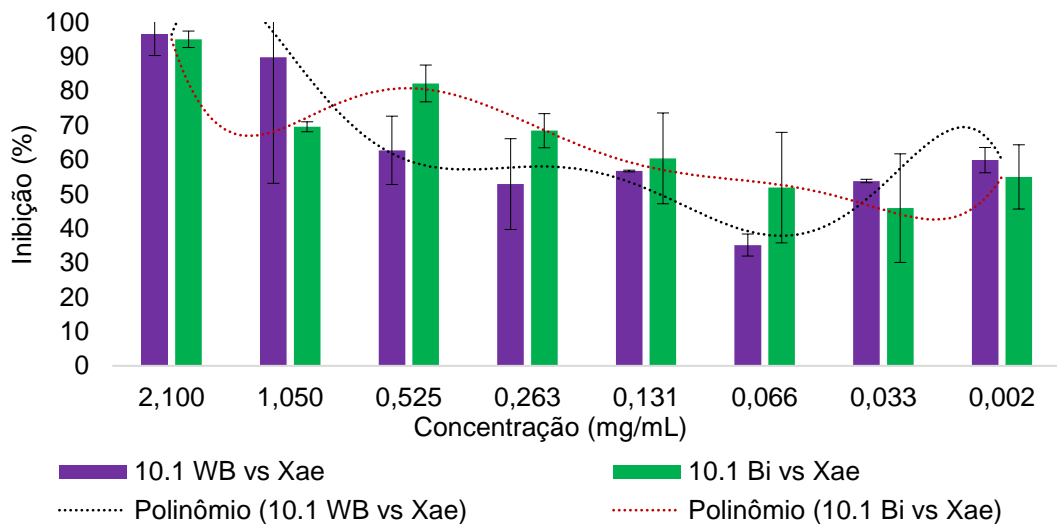
Os extratos A Bi e 7 Bi intracelulares foram ativos apenas contra *Xam* (Figura 31), já os também intracelulares 10.1 Bi e 10.1 WB foram bioativos para *Xae* (Figura 32).

Figura 31 - Relação dose-resposta dos extratos A Bi e 7 Bi intracelulares contra *Xam*



O extrato A Bi inibiu, em concentração inicial, 92,54% de células bacterianas de *Xam*, enquanto que o extrato 7 Bi inibiu 90,37%. Este último apresentou valores de inibição maiores que os exibidos pelo extrato A Bi nas mesmas concentrações, o qual, por outro lado, apresentou valores de desvio padrão mais discrepantes.

Figura 32 - Relação dose-resposta dos extratos 10.1 Bi e 10.1 WB intracelulares contra



Xae

O extrato intracelular do isolado 10.1 WB inibiu 96,56% de células de *Xae*, já o extrato de 10.1 Bi de mesma origem celular inibiu 95,03%, ambos a 2,1mg/mL. Ambos exibiram comportamento semelhante na ação dose-resposta, com alto poder inibitório mesmo na menor concentração testada.

5.11 Concentração Mínima Inibitória (MIC 90) e Concentração Mínima Bactericida (MBC)

A concentração mínima necessária para cada extrato atingir inibição de 90% das células bacterianas (MIC 90) foi calculada a partir da equação polinomial extraída dos respectivos gráficos dose-resposta. Os resultados para cada extrato estão na tabela 12.

Tabela 12 - Valores de MIC 90 (em mg/mL) e seus respectivos desvios padrão para os extratos intracelulares bioativos contra *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xae*) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*).

Extrato	MIC 90 (<i>Xae</i>)	MIC 90 (<i>Xam</i>)
	(mg/mL)	(mg/mL)
10.1 WB	2,447 ± 0,9385	-
10.1 Bi	2,593 ± 0,9143	-
6 Bi'	1,346 ± 0,9143	1,223 ± 0,9143
B Bi	2,567 ± 0,9143	1,578 ± 0,9143
A Bi	-	2,347 ± 0,9143
7 Bi	-	1,953 ± 0,9143

Tiveram ação bactericida contra *Xae* os extratos 10.1 Bi, a 2,1mg/mL e 6 Bi' a 1,050mg/mL. Contra *Xam* a ação bactericida ocorreu nos extratos 6 Bi1 e A Bi, a 2,1mg/mL e B Bi a 1,050mg/mL. Os demais apresentaram caráter bacteriostático.

5.12 Resultados para extratos produzidos por fungos isolados de solo abaixo de gelo e solo alagado na Ilha Rei George, Antártica.

Foram reativados 46 fungos filamentosos provenientes de amostras de solo da Ilha Rei George, Antártica, nos ensaios contra *Xae* e *Xam*. No total, foram 92 extratos testados, sendo 46 extracelulares e 46 intracelulares, entretanto nenhum apresentou bioatividade superior a 90% para as espécies estudadas (Tabela 13).

Tabela 13 - Triagem qualitativa dos extratos quanto à atividade antibacteriana contra *X. euvesicatoria* e *X. ax. pv. manihotis*

Código do Isolado	<i>Xae</i>		<i>Xam</i>	
	Extra	Intra	Extra	Intra

A_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
B_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
C_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
D_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
E_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
F_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
G_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
I_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
J_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
K_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
L_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
M_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
P_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
2'_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
2''_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
3'_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
3''_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
4''_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
5_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
6_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
7_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
8_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
9_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
10.B_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
10.C_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
10.D_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
10.E_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
10.F_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
11_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
12_4.0	(-)	(-)	(-)	(-)
A_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
1_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
1'_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
1''1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
2_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
3_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
3''_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
4_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
5_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
10.2_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
10.3_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
10.4_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)

10.5_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
10.6_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
10.7_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)
10.8_1.6	(-)	(-)	(-)	(-)

**Xae* = *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xam* = *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. (+) Positivo; (-) Negativo; (/) Não testado. Intra = Extrato Intracelular; Extr a= Extrato extracelular. São considerados positivos aqueles extratos cuja porcentagem de inibição bacteriana foi igual ou superior a 90. A concentração dos extratos é de 2,1mg/mL.

Os extratos produzidos por esses isolados estão sendo submetidos a mais ensaios, dessa vez, contra outras espécies de *Xanthomonas*, e vêm apresentando resultados positivos.

6 CONCLUSÃO

Assim, 11 extratos provenientes de fungos de sedimentos marinhos foram bioativos, dos quais 2 extracelulares mostraram efeito em ambas as espécies testadas. Dos demais, 5 extracelulares foram bioativos apenas para *Xam* e 2 intracelulares somente para *Xae*.

Dentre os resultados para extratos de fungos coletados em solo abaixo de madeira podre, 5 foram bioativos, e os testes foram realizados apenas para *Xam*. Destes, 2 são de origem extracelular e os outros 3 são intracelulares.

Dos resultados para fungos de solo abaixo de barra de ferro, 3 foram positivos, porém nenhum para ambas as espécies. 2 extracelulares mostraram ser bioativos apenas contra *Xae*, e 1 intracelular apenas contra *Xam*.

Finalmente, 6 extratos, todos intracelulares e provenientes de fungos coletados em biofilme foram bioativos, dos quais 2 foram ativos para ambas, outros 2 apenas para *Xae* e 2 restantes para *Xam*.

A análise dos resultados permite também concluir que fungos antárticos, em especial os dos gêneros *Pseudogymnoascus* e *Penicillium*, são potenciais produtores de compostos bioativos contra as espécies de bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e *Xanthomonas euvesicatoria*.

REFERÊNCIAS

- ADDOH, P. G. Nouvelle maladie bactérienne du manioc au Nigeria. **Circular of the conseil phytosanitaire interafricain**, v. 72, n. 18, 1972.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Acad. Press, 1988.
- ANDERSON, D. I.; HUGHES, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 5, p. 901-911, 2011.
- ARRIETA-ORTIZ, M. L.; RODRÍGUEZ-R, L. M.; PÉREZ-QUINTERO, Á. L.; POULIN, L.; DÍAZ, A. C.; ROJAS, N. A.; TRUJILLO, C.; BENAVIDES, M. R.; BART, R.; BOCH, J.; BOUREAU, T.; DARRASE, A.; DAVID, P.; BERNONVILLE, T. D.; FONTANILLA, P.; GAGNEVIN, L.; GUÉRIN, F.; JACQUES, M. A.; LAUBER, E.; LEFEUVRE, P.; MEDINA, C.; MEDINA E.; MONTENGREO, N.; BODNAR, A. M.; NOËL, L. D.; QUIÑONES, J. F. O.; OSORIO, D.; PARDO, C.; PATIL, P. B.; POUSSIER, S.; PRUVOST, O.; ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; RYAN, R. P.; TABIMA, J.; MORALES, O. G. U.; VERNIÈRE, C.; CARRERE, S.; VERDIER, V.; SZUREK, B.; RESTREPO, S.; LÓPEZ, C.; KOEBNIK, R.; BERNAL, A. Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79704, 2013.
- BONDAR, G. Uma nova moléstia bacteriana das hastes da mandioca. **Chacaras e quintaes**, v. 5, n. 4, p. 15-18, 1912.
- BORKAR, S. G.; YUMLEMBAM, R. A. **Bacterial Diseases of Crop Plants**. CRC Press, 2016.
- BOURIQUET, M. Mosaïque et maladie bacterienne du manioc. **Bouriquet, M. Recherches systematiques, biologiques et citologiques sur les maladies des plantes cultivees in Madagascar**. p. 85-113, 1939.
- BOUZAR, H.; MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; LACY, G. H. Bacterial spot-worldwide distribution, importance and review. In: **I International Symposium on Tomato Diseases 695**. 2004. p. 27-34.
- BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. CAB International, 1986.
- CABI. **Invasive species compendium**. Wallingford: UK, 2018.
- CARVALHO, L. J. C. B.; Biodiversidade e biotecnologia em mandioca (*Manihot esculenta Crantz*). **Congresso Brasileiro de Mandioca**. Campo Grande: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.
- CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; PAN, W. L.; CHAN, Y. S.; YIN, C. M.; DAN, X. L.; WANG, H. X.; FANG, E. F.; LAM, S. K.; NGAI, P. H. K.; XIA, L. X.; LIU, F.; YE, X. Y.;

ZHANG, G. Q.; LIU, Q. H.; SHA, O.; LIN, P.; KI, C.; BEKHIT, A. A.; BEKHIT, A. E.; WAN, D. C. C.; YE, X. J.; XIA, J.; NG, T. B. Antifungal and antiviral products of marine organisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3475-3494, 2014.

CHRISTOU, P.; TWYMAN, R. M. The potential of genetically enhanced plants to address food insecurity. **Nutrition research reviews**, v. 17, n. 1, p. 23-42, 2004.

CLARKE, J.; KERRY, K.; FOWLER, C.; LAWLESS, R.; EBERHARD, S.; MURPHY, R. Post-fledging and winter migration of Adélie penguins *Pygoscelis adeliae* in the Mawson region of East Antarctica. **Marine Ecology Progress Series**, v. 248, p. 267-278, 2003.

DING, Z.; LI, L.; CHE, Q.; LI, D.; GU, Q.; ZHU, T. Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 425-435, 2016.

DYE, D. W. Cultural and biochemical reactions of additional *Xanthomonas* spp. **New Zealand Journal of Science**, v. 9, n. 4, p. 913-&, 1966.

ENCHEVA-MALINOVA, M.; STOYANOVA, M.; AVRAMOVA, H.; PAVLOVA, Y.; GOICHEVA, B.; IVANOVA, I.; MONCHEVA, P. Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 4, p. 721-727, 2014.

ENCHEVA-MALINOVA, M.; VANCHEVA, T.; BADZHINEROV, N.; KOLEVA, V.; TISHKOV, S.; BOGATZEVSKA, N.; MONCHEVA, P. Antimicrobial activity of Antarctic Streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. **Annuaire de l'Université de Sofia "St Kliment Ohridski" Faculte de Biologie**, v. 100, n. 4, p. 216-222, 2015.

EPPO GLOBAL DATABASE. *Xanthomonas euvesicatoria* (**XANTEU**). 2018. Disponível em <<https://gd.eppo.int/taxon/XANTEU/distribution>> Acesso em 14 mar. 2018.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>> Acesso em 8 mar. 2018.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Mandioca**: um guia para a intensificação sustentável da produção. Roma: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, 2013.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Meeting the 2015 international hunger targets**: taking stock of uneven progress. Food and agriculture organization publications: Rome, 2016.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The future of food and agriculture**. Food and agriculture organization publications: Rome, 2017.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of food insecurity in the world 2015**: meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. Food and agriculture organization publications: Rome, 2016.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. **Mandioca e derivados**. Cruz das Almas: Embrapa mandioca e fruticultura, 2011.

FRISON, E. A.; FELIU, E. **FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of cassava germplasm**. Bioersivity International, 1991.

FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZARI, F. M.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; CARVALHO, A. G. O.; GIL, L. H. V. G.; ROSA, C. A.; MINNIS, A. M.; ROSA, L. H. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial ecology**, v. 67, n. 4, p. 775-787, 2014.

GODINHO, V. M.; GONÇALVES, V. N.; SANTIAGO, I. F.; FIGUEREDO, H. M.; VITORELI, G. A.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J. G.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, Á. J.; KROON, E. G.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; DUKE, S. O.; ALI, A.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, n. 3, p. 585-596, 2015.

GONÇALVES, V. N.; CARVALHO, C. R.; JOHANN, S.; MENDES, G.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S. MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biology**, v. 38, n. 8, p. 1143-1152, 2015.

GROXKO, E. M. Aspectos econômicos da mandioca. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2011/12**. Paraná: 2011.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: **Xanthomonas**. Springer, Dordrecht, 1993, p. 1-119.

HENRÍQUEZ, M.; VERGARA, K.; NORAMBUENA, J.; BEIZA, A.; MAZA, F.; UBILLA, P.; ARAYA, I.; CHÁVEZ, R.; SAN-MARTÍN, A.; DARIAS, J.; DARIAS, M. J.; VACA, I. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 65-76, 2014.

HOLDGATE, M. W. Life sciences - Terrestrial ecosystems in the Antarctic. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 279, n. 963, p. 5-25, 1977.

IBGE. **Portal IBGE**. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/>> Acesso em 24 mar. 2018.

JAMES, C. L. I. V. E. Global food security. In: **Abstracts, 7th International Congress of Plant Pathology**, Edinburgh, UK, August, 1998.

LEY, J. Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, application, prospects. In: **Proc. 4th Int. Conf. Plant. Path. Bact. Angers 1978**. 1978. p. 347-357.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J. G.; DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. **The botanical review**, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.

LIM, C.; KIM, J.; CHOI, J. N.; PONNUSAMY, K.; JEON, Y.; KIM, S.; KIM, J. G.; LEE, C. H. Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 20, n. 3, p. 494-500, 2010.

LOGAN, J. Plant pathology in Zambia. **PANS Pest Articles & News Summaries**, v. 20, n. 2, p. 169-176, 1974.

LÓPEZ, C. E.; BERNAL, A. J. Cassava bacterial blight: using genomics for the elucidation and management of an old problem. **Tropical Plant Biology**, v. 5, n. 1, p. 117-126, 2012.

LOZANO, J. C. Cassava bacterial blight: a manageable disease. **Plant Dis**, v. 70, n. 12, p. 1989-1993, 1986.

LOZANO, J. C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: epidemiology and control. **Phytopathology**, v. 64, n. 1, p. 83-88, 1974.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012.

MARAITE, H.; MEYER, J. A. *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Starr, causal agent of bacterial wilt, blight and leaf spots of cassava in Zaire. **PANS Pest Articles & News Summaries**, v. 21, n. 1, p. 27-37, 1975.

MARCANO, M.; TRUJILLO, G. Bacteriosis de la yuca: identificados algunos aspectos epidemiológicos del pathogeno que pueden utilizarse para disminuir los danos ocasionados por la enfermedad. **Fonaiap Divulga (Venezuela)**, v. 1, p. 12-13, 1982.

MARCUZZO, L. L. Aspectos epidemiológicos de sobrevivência e de ambiente no gênero *Xanthomonas*. **Ágora: revista de divulgação científica**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2009.

MATTOS, P. L. P.; FARIAS, A. R. N.; FERREIRA FILHO, J. R. **Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Embrapa Informação Tecnológica: Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

MONCHEVA, P.; TISHKOV, S.; DIMITROVA, N.; CHIPEVA, V.; ANTONOVANIKOLOVA, S.; BOGATZEVSKA, N. Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. **Journal of Culture Collections**, v. 3, 2002.

MULDERIJ, R. **Overview global tomato market**. Fresh Plaza, 2018.

MURATE, L. S.; OLIVEIRA, A. G.; HIGASHI, A. Y.; BARAZETTI, A. R.; SIMIONATO, A. S.; SILVA, C. S.; SIMÕES, G. C.; SANTOS, I. M. O.; FERREIRA, M. R.; CELY, M. V. T.; NAVARRO, M. O. P.; FREITAS, V. F.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P.; LEITE JÚNIOR, R. P.; ANDRADE, G. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. **Agricultural Sciences**, v. 6, n. 3, p. 295-303, 2015.

MURRAY, C. D.; DERMOTT, S. F. **Solar system dynamics**. Cambridge university press, 1999.

NEDIALKOVA, D.; NAIDENOVA, M. Screening the antimicrobial activity of Actinomycetes strains isolated from Antarctica. **Journal of Culture Collections**, v. 4, n. 1, 2005.

OECD. **Innovation in food and agriculture**. 2018. Disponível em <<http://www.oecd.org/tad/agricultural-policies/innovation-food-agriculture.htm>> Acesso em 18 abr. 2018.

ØVSTEDAL, D. O.; SMITH, R. L. **Lichens of Antarctica and South Georgia: a guide to their identification and ecology**. Cambridge University Press, 2001.

O'HAIR, S. K. **Cassava: new crop factsheet**. Purdue university: West Lafayette, 1998.

ØVSTEDAL, D. O.; SMITH, R. L. **Lichens of Antarctica and South Georgia: a guide to their identification and ecology**. Cambridge University Press, 2001.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PEREZ, P. Bancos de germoplasma garantem futuro da cultura: entrevista com Nivaldo Peroni. **Projeto Mandioca Brasileira**.

POTNIS, N.; TIMILSINA, S.; STRAYER, A.; SHANTHARAJ, D.; BARAK, J. D.; PARET, M. L.; VALLAD, G. E.; JONES, J. B. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular plant pathology**, v. 16, n. 9, p. 907-920, 2015.

PRICE, D. D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1769-1772, 2000.

PURIĆ, J.; VIEIRA, G.; CAVALCA, L. B.; SETTE, L. D.; FERREIRA, H.; VIEIRA, M. L. C.; SASS, D. C. Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. **Letters in applied microbiology**, v. 66, n. 6, p. 530-536, 2018.

RITCHIE, D. F. Bacterial spot of pepper and tomato. **The Plant Health Instructor [online]**, 2000.

RODRIGUEZ-R, L. M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; SALAZAR, C.; RESTREPO, S.; BERNAL A. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 43, 2012.

ROSA, L. H.; VAZ, A. B.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv (Poaceae). **Polar Biology**, v. 32, n. 2, p. 161-167, 2009.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 1-3, p. 127-141, 2007.

RUNSTEN, L.; TAPIO-BISTRÖM, M. L. Land tenure, climate change mitigation and agriculture. **Mitigation of climate change in agriculture (MICCA) project**, 2011.

SANTIAGO, I. F.; SOARES, M. A.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, n. 6, p. 1087-1097, 2015.

SEBRAE. **Estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula)**. Sebrae: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas: 2008.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G. S. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: **Yeast biotechnology: Diversity and applications**. Springer, Dordrecht, 2009. p. 3-18.

SILBER, J.; OHLENDORF, B.; LABES, A.; ERHARD, A.; IMHOFF, J. F. Calcarides A–E, antibacterial macrocyclic and linear polyesters from a Calcarisporium strain. **Marine drugs**, v. 11, n. 9, p. 3309-3323, 2013.

SILVA, G. H.; COSTA, V. P.; CAMPOS, V. P.; OLIVEIRA, D. F.; PFENNING, L. H. Bioactive Fungal metabolites. Impact and Exploitation. In: **International Symposium. Br. Mycol. Soc., Wales Swansea, UK**. 2001.

SILVA, I. C.; FERREIRA, H. Drug Sensitivity Assay of Xanthomonas. citri subsp. citri Using REMA Plate Method. **Journal of Bacteriology**, 2013.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L. S.; FRANÇA, F. H.; VILLAS BÔAS, G. L.; BRANCO, M. C.; MEDEIROS, M. A.; MAROUELLI, W.; SILVA, W. L. C.; LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C.; NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, W. **Cultivo de tomate para industrialização**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003.

SPAGO, F. R.; MAURO, C. S. I.; OLIVEIRA, A. G.; BERANGER, J. P. O.; CELY, M. V. T.; STANGANELLI, M. M.; SIMIONATO, A. S.; SAN MARTIN, J. A. B.; ANDRADE, C. G. T. J.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic Xanthomonas species. **Crop Protection**, v. 62, p. 46-54, 2014.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual review of phytopathology**, v. 43, 2005.

ŠUTIC, D. Tomato bacteriosis. **Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja, Beograd [Spec. Edit. Inst. Plant Prot., Beograd]**, v. 6, 1957.

SVAHN, K. S.; CHRYSANTHOU, E.; OLSEN, B.; BOHLIN, L.; GÖRANSSON, U. *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. **Fungal biology and biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2015.

THE DAILY RECORDS. **Top 12 largest tomato producing countries in the world.** The Daily Records, 2018.

THE ECONOMIST GROUP. **Global Food Security Index.** 2018. Disponível em: <<https://foodsecurityindex.eiu.com/>> Acesso em 8 mar. 2018.

TROELL, M.; NAYLOR, R. L.; METIAN, M.; BEVERIDGE, M.; TYEDMERS, P. H.; FOLKE, C.; ARROW, K. J.; BARRETT, S.; CRÉPIN, A. S.; EHRLICH, P. R.; GREN, A.; KAUTSLY, N.; LEVIN, S. A.; NYBORG, K.; ÖSTERBLOM, H.; POLASKY, S.; SCHEFFER, M.; WALKER, B. H.; XEPAPADEAS, T.; ZEEUW, A. Does aquaculture add resilience to the global food system?. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 111, n. 37, p. 13257-13263, 2014.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VIEIRA, G.; PURIĆ, J.; MORÃO, L. G.; SANTOS, J. A.; INFORSATO, F. J.; SETTE, L. D.; FERREIRA, H.; SASS, D. C. Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Letters in applied microbiology**, 2018.

VINCENT, W. F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, v. 12, n. 3, p. 374-385, 2000.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, n. 1, p. 153-177, 1978.

ANEXOS

Imagens de alguns dos fungos utilizados na pesquisa.

Isolados de amostras de solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception, Antártica.

Deception
(Pendulum Cove)
2 Fe



Deception
(Pendulum Cove)
3.1 Fe



Deception
(Pendulum Cove)
4 Fe



Deception
(Pendulum Cove)
5 Fe



Deception
(Pendulum Cove)
5.1 Fe



Deception
(Pendulum Cove)
6 Fe



Deception
(Pendulum Cove)
B Fe



Deception
(Pendulum Cove)
D Fe

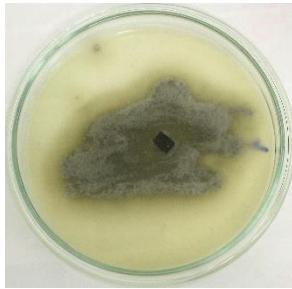


Deception
(Pendulum Cove)
E Fe



Isolados de amostras de sedimentos marinhos, em diversas regiões na Antártica.

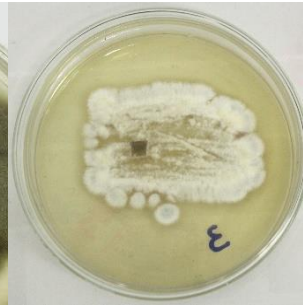
3A-1C415III
Cadophora



4B-C115III
Cladosporium



2B-1C115III
Pseudogymnoascus



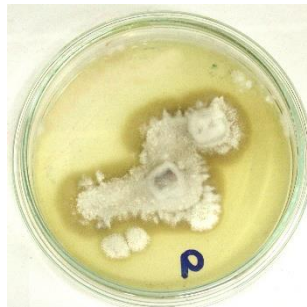
2B-1C115II
Penicillium



5A-1C115II
Paraconiothyrium



5A-1C715III
Pseudogymnoascus



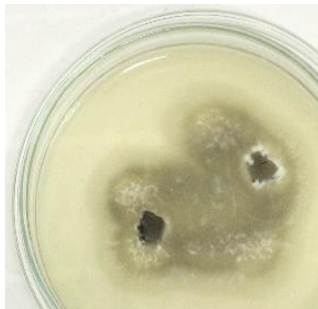
3A-1C315III
Cadophora



2A-1C115II
Penicillium



2A-1C1III
Pseudogymnoascus



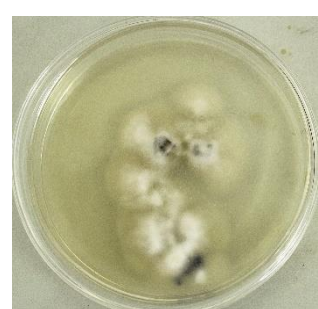
6DC415I
Pseudogymnoascus



3A-1C215IIIIC
Cadophora



2D-C615IA
Pseudogymnoascus



5DC115I
Paraconiothyrium



2D-3C115III
Pseudogymnoascus



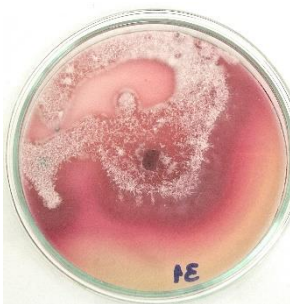
5D-3C115II
Toxicocladosporium



6D-C215III
Pseudogymnoascus



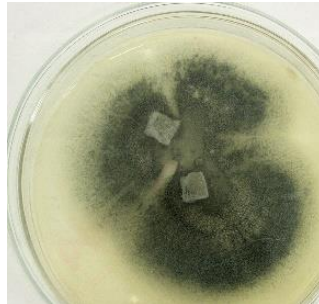
6D-C4III
Pseudogymnoascus



5DC1III
Pseudogymnoascus



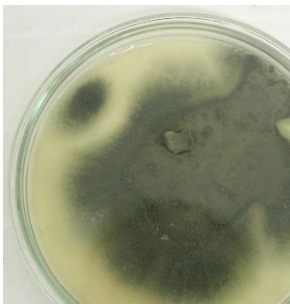
2DC715III
Penicillium



5B-1C315IIIB
Penicillium



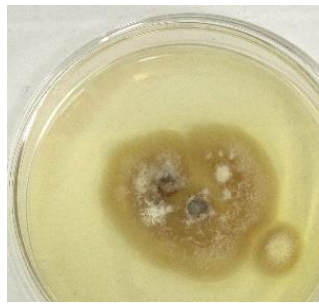
3DC615I
Penicillium



4DC115II
Penicillium

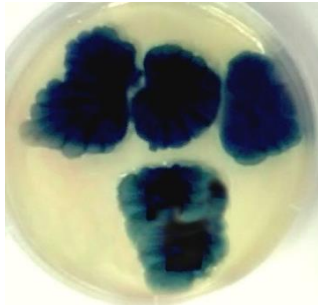


2D-3C115III
Pseudogymnoascus



Isolados de amostras de solo alagado (1.6) e solo abaixo do gelo (4.0) na Ilha Rei George, Antártica.

Rei George
(Ponta Turret)
2'_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
10_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
3''_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
4'_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
G_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
1''_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
2''_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
10E_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
10F_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
11_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
F_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
L_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
M_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
12_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
7_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
J_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
10D_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
i_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
K_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
10C_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
9_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
A_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
10B_4.0



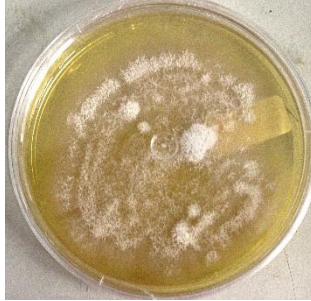
Rei George
(Ponta Turret)
6_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
4''_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
C_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
E_4.0



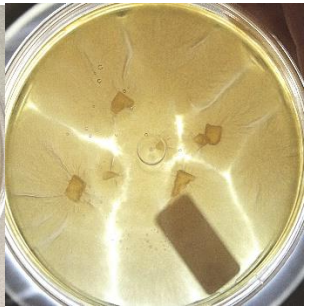
Rei George
(Ponta Turret)
B_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
1'_4.0



Rei George
(Ponta Turret)
5_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
10.2_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
A_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
4_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
10.7_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
1_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
10.8_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
2_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
10.5_1.6



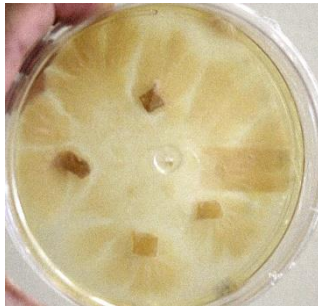
Rei George
(Ponta Turret)
10.3_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
10.4_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
10.5(2)_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
3_1.6



Rei George
(Ponta Turret)
10.6_1.6

