

Atividade celulolítica *in vitro* de *Cylindrocladium clavatum* e o efeito de filtrados de cultivo do fitopatógeno sobre plântulas de eucalipto

Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada^{1*}, José Renato Stangarlin², Ana Cristina Grade Fiori¹ e Sérgio Florentino Pascholati³

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Pernambuco 1777, 85960-000, Mal. Cândido Rondon, Paraná, Brasil. ³Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Av. Pádua 11, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. Em condições de viveiro, as doenças que mais afetam as mudas de eucalipto são tombamento e podridão de estacas para enraizamento causadas por *Cylindrocladium clavatum*. O mecanismo de ataque deste patógeno não está esclarecido, mas sabe-se que exoenzimas e fitotoxinas, produzidas por fungos fitopatogênicos, são importantes na penetração e colonização do hospedeiro. Dessa forma, o trabalho teve como objetivos demonstrar a produção *in vitro* de enzimas celulolíticas e a de metabólitos tóxicos em plântulas de *Eucalyptus urophylla* por *C. clavatum*. Os resultados obtidos permitiram concluir que a celulase produzida pelo fungo é um complexo multienzimático que compreende duas endo e três exo β -1,4 glucanases e uma β -glucosidase, sendo que *C. clavatum* é capaz de produzir tais enzimas *in vitro*, quanto cultivado em diferentes substratos. A presença de metabólitos tóxicos, relacionada ao aparecimento de sintomas da doença em plântulas de *E. urophylla*, foi também observada.

Palavras-chave: exoenzimas; fototoxinas; eucalipto; *Cylindrocladium clavatum*.

ABSTRACT. The *in vitro* production of Cellulolytic activity and the effect of *Cylindrocladium clavatum* in *Eucalyptus urophylla* seedlings. Under nursery conditions, the diseases which mostly affect the *Eucalyptus* seedlings are damping-off and cutting rot for rooting, caused by *Cylindrocladium clavatum*. The mechanism of attack of this pathogen is not completely understood, but it is known that phytotoxins and exoenzymes, produced by phytopathogenic fungi, are important in host penetration and colonization. Thus, the objectives of this investigation were to demonstrate the *in vitro* production of cellulolytic enzymes and toxic metabolites of *C. clavatum* in *E. urophylla* seedlings. Results showed that cellulase produced by fungus is a multienzymatic complex consisting of two endo and three exo β -1,4 glucanases and one β -glucosidase, and that *C. clavatum* can produce such *in vitro* enzymes when cultivated in different substrates. The presence of toxic metabolites, related to disease symptoms appearance in *E. urophylla* seedlings was also observed.

Key words: exoenzymes, phytotoxins, *Eucalyptus*, *Cylindrocladium clavatum*.

Introdução

A constante busca de florestas cada vez mais produtivas para atender à crescente demanda de madeira tem levado as empresas florestais à implantação de plantios por estaquia. Entretanto, durante a produção de mudas, a incidência de fungos apodrecedores de estacas tem se destacado como um dos fatores responsáveis pela baixa eficiência do método (Ferreira, 1989, citado por Gonçalves, 1997). Dentre estes fungos, destaca-se *Cylindrocladium clavatum*, que em condições de viveiro pode causar, além da podridão, o tombamento de mudas e sintomas reflexos como

murcha, enrolamento e seca das folhas (Krugner e Auer, 1997).

Cylindrocladium spp. sobrevivem como microescleródios em tecidos de plantas infectadas e no solo infestado. Quando as raízes das plântulas entram em contato com os escleródios, estes germinam e a infecção ocorre. O fungo apresenta uma grande tolerância a variações de pH, o que ocasiona uma redução da eficiência das técnicas de controle cultural em viveiros (Forest, 2002).

Os sintomas nas plantas doentes sugerem a possibilidade do envolvimento de fitotoxinas no processo de desenvolvimento da doença. As

exoenzimas e fitotoxinas em fungos fitopatogênicos desempenham um papel importante na penetração e colonização do hospedeiro. No caso das exoenzimas, tem-se estudado sua participação na patogênese, e sua importância tem sido descrita em alguns patossistemas como *Gauemannomyces graminis* var. *tritici* x trigo; *Mycocentropora* x cenoura e *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* x algodão (Cam et al., 1994; Dori et al., 1995; Di Piero e Pascholati, 2000). Quanto às fitotoxinas, estas podem agir em diferentes sítios em nível celular, alterando a permeabilidade e/ou potencial das membranas, acarretando mudanças no equilíbrio iônico, perda de eletrólitos e aumento na respiração. Várias toxinas são reconhecidamente relacionadas à patogênese, sendo as mais estudadas as toxinas HV (victorina), HS (helminthosporosídeo), faseolotoxina e tabtoxina (Pascholati, 1995; Pascholati et al., 1998).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos demonstrar a produção *in vitro* de enzimas celulolíticas por *C. clavatum*, bem como a ação de metabólitos tóxicos deste fungo sobre plântulas de *Eucalyptus urophylla*.

Material e métodos

Determinação da atividade celulolítica

Atividade de exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91). A atividade de exo β -1,4 glucanase foi determinada através da repicagem de *C. clavatum* para 100 mL de meio MNM (Melin Norkrans Modificado) líquido. A glicose foi substituída por celulose microcristalina 1% (Avicel) a fim de induzir a produção da enzima. Cinco discos de micélio (4 mm de diâmetro), com 25 dias de crescimento em MNM, foram colocados em erlenmeyers, os quais permaneceram a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, sob agitação constante (150 rpm), durante 30 dias. Alíquotas de 5 mL do meio de cultivo foram coletadas a cada 6 dias, sendo consideradas fontes enzimáticas. Estas por sua vez foram conservadas a -20°C e utilizadas posteriormente em ensaios de atividade celulolítica.

O método espectrofotométrico indireto foi o utilizado para se determinar a atividade de exo β -1,4 glucanase, tendo como base a liberação de moléculas de glicose a partir do substrato celulose microcristalina (Avicel). A mistura de reação consistiu de 50 μL da fonte enzimática e 450 μL de celulose microcristalina 1% em tampão acetato de sódio 0,05M (pH 5,0). A mistura foi incubada por 30 min a 50°C e a reação interrompida com a adição de 1,5 mL da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 1% (HAPHB) em álcali (0,5 g de HAPHB dissolvido em 10 mL de HCl 0,5 M, acrescido de 40 mL de NaOH 0,5M). Após a incubação, a mistura foi

mantida a 100°C por 5 min e em seguida resfriada em gelo (Lever, 1972). A leitura de absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (1,5 mL de HAPHB + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05M). De cada amostra, subtraiu-se o valor do controle (mistura idêntica a da amostra, mas sem incubação prévia). Foram utilizadas três repetições por amostra. As leituras de absorbância foram plotadas em curva-padrão para glicose, e a atividade enzimática específica foi expressa em μg de glicose/min/mg proteína.

Atividade de endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4). Para a produção de endo β -1,4 glucanase, foi utilizado, como indutor carboximetilcelulose (CMC), 1% com ou sem *start* de glicose (0,1%), adicionado em meio líquido MNM. As condições de cultivo foram as mesmas descritas para a exo β -1,4 glucanase. A atividade enzimática foi determinada por método espectrofotométrico indireto, utilizando-se hidrazida do ácido β -hidroxibenzóico 1% (HAPHB) para dosagem de glicose liberada pela ação da enzima sobre CMC (Lever, 1972). A mistura de reação consistiu em 50 μL da fonte enzimática (obtida conforme 1.1) e 450 μL de CMC 1% em tampão acetato de sódio 0,05M (pH 5,0). Após 30 min de incubação, a 50°C , a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de HAPHB. Em seguida, foi aquecida a 100°C por 5 min e resfriada em gelo. A absorbância da mistura foi determinada a 410 nm contra branco [1,5 mL HAPHB + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0)] e as leituras plotadas em curva-padrão para glicose. Os resultados foram expressos em μg de glicose/min/mg proteína.

Atividade de β -glicosidase (EC 3.2.1.21). Celobiose 1% e carboximetilcelulose 1% foram utilizados como indutores para a produção da enzima e também como fontes de carbono no meio de cultivo MNM líquido, mantendo-se as mesmas condições de incubação para os isolados fúngicos e coleta de amostras, como descritos anteriormente. Para determinação da atividade enzimática foi empregado *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. A mistura de reação, incubada a 50°C por 30 min, consistiu de 300 μL de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 0,02 M em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) e 200 μL da fonte enzimática. Após a incubação, foram adicionados 500 μL de solução de Na_2CO_3 1 M para paralisar a reação. O *p*-nitrofenol (*p*-NP) liberado, como resultado da ação enzimática, foi determinado espectrofotometricamente a 405 nm (Deshpande e Eriksson, 1988). As leituras de absorbância foram

plotadas em curva-padrão para ρ -nitrofenol e os resultados da atividade específica expressos em μg de ρ -NP/min/mg proteína.

Teor de proteínas totais. A quantificação de proteínas totais presentes no filtrado de *C. clavatum* foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976). A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de albumina de soro bovino (ASB) em 0,8 mL de amostra (μg proteína/0,8 mL), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentração de ABS variando de 0 a 20 μg /0,8 mL.

Caracterização das enzimas celulolíticas de *C. clavatum* por cromatografia de filtração em gel

O fungo *C. clavatum* foi cultivado a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro e sob agitação constante, em 100 mL de meio MNM líquido, onde glicose foi substituída por CMC 1%. Após 30 dias, o conteúdo de cada erlenmeyer foi filtrado em papel de filtro Whatman n°41 e concentrado a 4°C com sulfato de amônio (85% de saturação). Essa mistura ficou em repouso por 5 h, a 4°C . Após esse período, foi centrifugada a 20.000 g por 25 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 2,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). Esse material ressuspenso foi colocado em membrana de diálise, com limite de exclusão molecular de 20.000 Daltons, e mantido no interior de uma cuba contendo 2 L de tampão acetato de sódio 0,05 M a 4°C , com agitação magnética. A amostra permaneceu sob diálise por 18 h.

A coluna de cromatografia (23 cm de comprimento x 1,6 diâmetro), preenchida com gel Sephacryl S-100HR, foi equilibrada e eluída com tampão acetato 0,15 M (pH 5,) em fluxo de 1 mL/min. Um mL da amostra concentrada foi aplicado na coluna e cada fração coletada (com volume de 1,6 mL) e analisada individualmente em espectrofotômetro a 280 nm. As frações que apresentavam conteúdo proteico foram avaliadas quanto às atividades de exo e endo β -1,4 glucanases e β -glicosidase, conforme descrito em 1.1, 1.2 e 1.3, respectivamente. A massa molecular relativa de cada isoenzima detectada foi estimada utilizando-se uma curva de calibração com as proteínas padrão albumina de soro bovino (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), citocromo C (14 kDa), aprotinina (6,5 kDa) e bacitracina (1,45 kDa).

Metabólitos tóxicos

Para obtenção dos metabólitos tóxicos, 5 discos de micélio do fungo (4 mm de diâmetro) foram colocados em erlenmeyers com 100 mL de BD

(batata-dextrose). Os frascos foram mantidos a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro e sob agitação constante (250 rpm). Aos 5 e 10 dias de incubação, os meios de cultivo foram filtrados em papel de filtro Whatman n° 41. Os filtrados foram utilizados em dois bioensaios descritos a seguir.

Observação de sintomas em plântulas de *E. urophylla*. Plântulas obtidas pelo método do papel sanduíche (Chilvers *et al.*, 1986) foram colocadas em frascos com o sistema radicular imerso em 3 mL de cada tipo de filtrado. O conjunto foi mantido a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h de luz fluorescente até o aparecimento de sintomas em raízes e parte aérea. Foram também realizados bioensaios para observação dos sintomas nas plântulas quando colocadas em presença de suspensão de conídios do fungo (1×10^4 esporos/ml). O tratamento controle consistiu de filtrado de BD, sem a presença do fungo.

Quantificação da liberação de eletrólitos por condutivimetria. Raízes obtidas das plântulas de eucalipto, conforme descrito anteriormente, foram seccionadas em fragmentos de aproximadamente 3 mm de comprimento e colocadas imediatamente em contato com cada tipo de filtrado na presença de uma sonda de condutivímetro. Foram tomadas leituras de condutividade (expressas em Siemens – S) a cada 20 seg até que houvesse a estabilização dos valores. O tratamento-controle consistiu de filtrado de BD, sem a presença do fungo.

Resultados e discussão

Atividade enzimática *in vitro*

As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados da atividade enzimática *in vitro* de exo e endo β -1,4 glucanases e β -glicosidase, respectivamente. O patógeno foi capaz de produzir as enzimas celulolíticas nos diferentes meios de indução, apresentando uma maior atividade enzimática para exo e endoglucanase em relação à glicosidase.

No caso da exo- β -1,4 glucanase, foram observados dois picos de produção. O primeiro foi detectado aos 18 dias de cultivo e, após este período, ocorreu um decréscimo na atividade enzimática, que tornou a elevar-se aos 30 dias de cultivo. Sabe-se que a exo β -1,4 glucanase atua sobre a celulose cristalina solubilizando-a através da remoção de unidades de celobiose da cadeia de celulose. Porém, esta enzima também está sujeita à repressão catabólica através de celobiose ou glicose. Neste caso, é possível que *C. clavatum* tenha produzido a enzima até os 18 dias de

cultivo, período suficiente para a hidrólise parcial do substrato e produção de celobiose em quantidade capaz de inibir a enzima, determinando assim um decréscimo na atividade após este período.

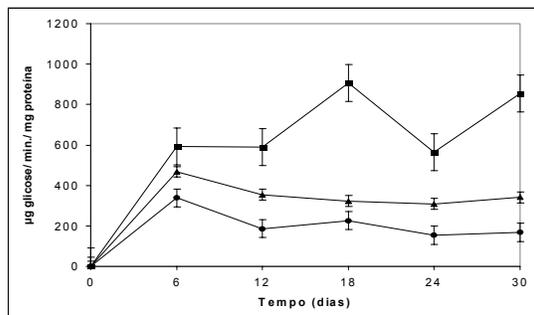


Figura 1. Produção da enzima endoglucanase em meio de cultivo MNM contendo carboximetilcelulose (CMC 1%) + glicose (0,1%) (●) ou apenas CMC (1%) (▲) e da enzima exoglucanase (■) em Avicel (1%) por *C. clavatum*. Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto. As barras indicam o erro padrão da média

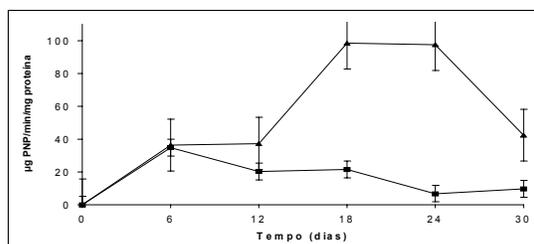


Figura 2. Produção de β -glicosidase por *C. clavatum* cultivado em meio MNM acrescido de celobiose 1% (■) e carboximetilcelulose 1% (▲). Atividade enzimática determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. As barras indicam o erro padrão da média

Em relação a endo β -1,4 glucanase, verificou-se que *C. clavatum* cultivado em CMC apresentou atividade enzimática relativamente menor, quando o meio foi suplementado com uma pequena quantidade de glicose (0,1%) como fonte de carbono, embora o comportamento em ambos os meios tenha sido praticamente o mesmo. A maior atividade enzimática ocorreu aos 6 dias de cultivo, com redução da mesma logo em seguida, permanecendo praticamente constante até o final do experimento. Poderia estar havendo uma repressão da atividade desta enzima na presença de glicose. Linkins e Antibus (1981) verificaram que a presença de glicose no meio reprimia a atividade de endoglucanase em *Cenococcum geophilum* e *Hebilotoma pusillum*.

C. clavatum apresentou incremento de atividade de β -glicosidase com o tempo de cultivo, atingindo um máximo aos 18 dias no meio onde a glicose foi

substituída por carboximetilcelulose 1% (Figura 2). Os valores de produção da enzima neste meio foram maiores quando comparados aos valores de atividade enzimática obtidos no meio com celobiose 1%. O pico de produção no meio de cultivo com celobiose ocorreu aos 6 dias, tendo diminuído logo em seguida. A baixa atividade apresentada pode indicar que a celobiose, na concentração utilizada, teria reprimido a ação enzimática extracelular, sendo esse substrato hidrolizado pela enzima celobiase intracelular, levando ao acúmulo de glicose que age como repressor enzimático (Mandels e Reese, 1960). A produção de β -glucosidase *in vitro* também já foi relatada por Peres *et al.* (2000) para *Fusarium*, *Ascochyta* e *Colletotrichum* e por Kader e Omar (1998), que observaram a produção da enzima por três espécies de *Aspergillus* e duas de *Trichoderma*, quando cultivadas em meios de cultivo suplementados com carboximetilcelulose.

Produção de metabólitos tóxicos

A Figura 3 apresenta o resultado da liberação de eletrólitos determinada por condutivimetria. A diferença observada entre os filtrados do meio de cultivo obtidos após 5 e 10 dias de crescimento do fungo e o controle pode indicar a presença de metabólitos tóxicos produzidos pelo patógeno. Para o filtrado obtido aos 10 dias de cultivo, a liberação de eletrólitos foi menor, indicando, possivelmente, a ocorrência de um pico de produção aos cinco dias, seguido de uma redução de atividade e perda de estabilidade dessa substância.

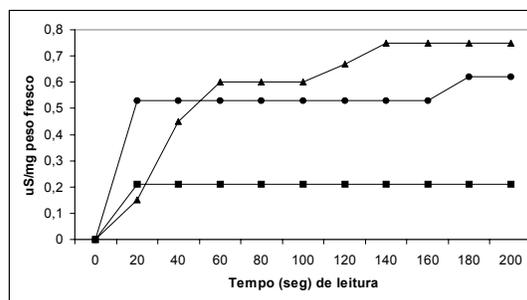


Figura 3. Atividade fitotóxica de filtrados de *C. clavatum* coletados aos 5 dias (▲) e 10 dias (●) de cultivo em BD (batata-dextrose). (■) Controle

Nos bioensaios onde plântulas foram colocadas nos filtrados do meio de cultivo, com cinco dias de crescimento fúngico, autoclavado ou não, foi possível notar uma redução do número de raízes laterais, murcha da parte aérea, amarelecimento e manchas necróticas nas folhas. Em presença da suspensão de conídios, as plântulas apresentaram escurecimento de

raiz e murcha da parte aérea. Bousquet e Kollmann (1998), em estudos sobre a produção de metabólitos de isolados de *Septoria nodorum*, verificaram que várias toxinas estão envolvidas no desenvolvimento de sintomas desta doença.

Caracterização das enzimas celulolíticas de *C. clavatum* por cromatografia de filtração em gel.

Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 4 e 5. Foram detectadas duas isoenzimas com atividade de endoglucanase, três isoenzimas de exoglucanase e uma de β -glicosidase. A maior atividade de endoglucanase foi observada na isoenzima II, com massa molecular (MM) de 12,30kDa. Para a exoglucanase, a maior atividade foi obtida com a isoenzima III, com MM de 9,47kDa. A massa molecular relativa da única isoenzima obtida para a β -glucosidase foi de 45,54kDa. Os valores de massas moleculares obtidos para as demais isoenzimas encontram-se na Tabela 1.

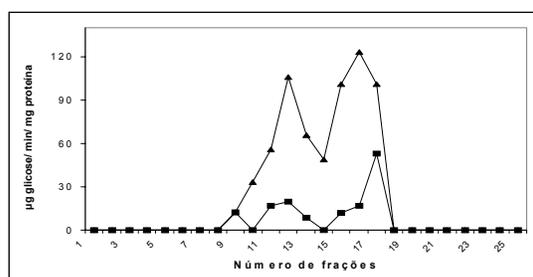


Figura 4. Separação em Sephacryl S-100HR de exo (■) e endo β -1,4 glucanase (▲) de *C. clavatum* a partir de 1,0 mL de filtrado concentrado (x40) e dialisado de meio de cultivo MNM com carboximetilcelulose (CMC) 1% como fonte de carbono. As frações (1,6 mL) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo celulose microcristalina (Avicel) e CMC como substratos para exo e endo β -1,4 glucanases, respectivamente. Isoenzimas indicadas por algarismos romanos

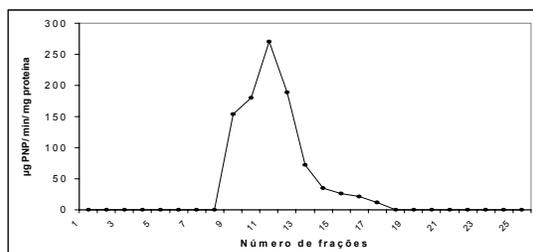


Figura 5. Separação em Sephacryl S-100HR de β -glicosidase de *C. clavatum*, a partir de 1,0 mL de filtrado concentrado (x40) e dialisado de meio de cultura MNM com carboximetilcelulose (CMC) 1%, como fonte de carbono. As frações (1,6 mL) foram coletadas e analisadas por método espectrofotométrico indireto, tendo β -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. Isoenzima indicada por algarismo romano

Tabela 1. Massas moleculares relativas de isoenzimas de endo β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanase e β -glicosidase, produzidas *in vitro* por *C. clavatum**

Isoenzimas	Massa molecular (kDa)		
	Endo β -1,4 glucanase	Exo β -1,4 glucanase	β -glicosidase
I	35,05	76,86	45,54
II	12,30	12,30	
III		9,47	

* Massas moleculares obtidas com base na curva de calibração com as proteínas-padrão albumina de soro bovino (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), citocromo C (14,2 kDa), aprotinina (6,5 kDa) e bacitracina (1,45 kDa)

As enzimas celulolíticas, conforme Cooper (1983), freqüentemente apresentam baixa massa molecular, são estáveis e suas atividades podem ser representadas por múltiplas formas ou isoenzimas, as quais diferem na carga, tamanho, regulação e capacidade de degradar paredes de células. As cinco endoglucanases isoladas de *Penicillium penophilum* apresentaram massas moleculares variando de 25 a 62 KDa (Wood, 1992).

Diante dos resultados obtidos, verifica-se a capacidade de *C. clavatum* em produzir enzimas celulolíticas e metabólitos tóxicos, que podem contribuir para a patogenicidade do fungo.

Referências

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.
- BOUSQUET, J.F.; KOLLMANN, A. Variation in metabolite production by *Septoria nodorum* isolates adapted to wheat or to barley. *J. Phytopathol.*, Berlin, v.146, p.273-277, 1998.
- CAM, B.L. *et al.* Cell wall polysaccharide-degrading enzymes produced by isolates of *Mycocentrospora acerina* differing in aggressiveness on carrot. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, London, v.44, p. 187-198, 1994.
- CHILVERS, G.A. *et al.* A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytol.*, Cambridge, v.103, p.397-402, 1986.
- COOPER, R.M. The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In: CALLOW, J.A. (Ed.). *Biochemical Plant Pathology*. Bath: John Wiley & Sons Ltd, 1983, p.102-130.
- DESHPANDE, V.; ERIKSSON, K.E. 1,4- β -glucosidases of *Sporotrichum pulverulentum*. In: WOOD, W.A.; KELLOGG, S.T. (Ed.). *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 1988. v.160, p.415-424.
- DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Produção de celulasas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* e seu papel na patogenicidade em algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v.26, p. 336-341, 2000.
- DORI, S. *et al.* Cell wall-degrading enzymes produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, Orlando, v.46, p. 189-198, 1995.

- FOREST Nursery Pests. [S. l.; s.n.], 2002. Disponível em <<http://www.forestpests.org/nursery/cylindrocladiumdiseases.html>>. Acesso em: 13 mar. 2002.
- GONÇALVES, R.C. *Podridão de estacas de Eucalyptus spp. causada por Cylindrocladium spp.* [S.l.:s.n.], 1997. Disponível em <<http://edivale.vilabol.uol.com.br/cylindrocladium.htm>> Acesso em: 6 dez. 2001.
- KADER, A.J.; OMAR, O. *Isolation of cellulolytic fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah.* [S.l.:s.n.], 1998. Disponível em < <http://www.arbec.com.my/pdf/july-2.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2002.
- KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças do Eucalipto. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Ceres, 1997. Cap. 33, p. 358-375.
- LEVER, M.A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.47, p. 273-279, 1972.
- LINKINS, A.E.; ANTIBUS, R.K. Mycorrhizae of *Salix rotundifolia*. In: LAURSERN, G.A. e AMMIRATI, F.F. (Ed.). *Arctic and Alpine Mycology*. Seattle: University of Washington Press, 1981, p.509-531.
- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.*, Washington, DC, v.79, p.816-826, 1960.
- PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Ceres, 1995. Cap.20, p.365-392.
- PASCHOLATI, S.F. et al. Mecanismos de patogenicidade em fungos. In: LUZ, W.C. (Ed.). *Revisão anual de patologia de Plantas*, v.6, p.1-47, 1998.
- PERES, A.P. et al. Perfil enzimático de fungos associados à podridão peduncular do mamão. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v.24, n.1, p. 295-299, 2000.
- WOOD, T.M. Fungal cellulases. *Biochemistry of Plant Polysaccharides*, v.20, p.46-53, 1992.

Received on April 26, 2002.

Accepted on June 20, 2003.