



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Arrabidaea
bilabiata* COM MARCADORES MOLECULARES
AFLP E TESTE DE EXTRATOS EM FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Luciana Souza de Aguiar e Souza

Manaus
2010



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUCIANA SOUZA DE AGUIAR E SOUZA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Arrabidaea
bilabiata* COM MARCADORES MOLECULARES
AFLP E TESTE DE EXTRATOS EM FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira da Silva

Manaus
2010

Ficha Catalográfica
realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

(Catalogação

Souza, Luciana Souza de Aguiar e

S729v

Variabilidade genética de *Arrabidaea bilabiata* com marcadores moleculares AFLP e teste de extratos em fungos fitopatogênicos / Luciana Souza de Aguiar e Souza. - Manaus: UFAM, 2010.

110 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira da Silva

1. Plantas tóxicas 2. Marcadores moleculares 3. Biotecnologia I. Silva, José Ferreira da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 633.88(043.3)

Luciana Souza de Aguiar e Souza

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Arrabidaea bilabiata* COM MARCADORES MOLECULARES AFLP E TESTE DE EXTRATOS EM FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Jânia Lília da Silva Bentes - Universidade Federal do Amazonas

Pedro Queiroz da Costa Neto - Universidade Federal do Amazonas

Rozana Medeiros Galvão - Universidade Federal do Amazonas

Expedita Maria de Oliveira Pereira - Universidade Federal do Amazonas

Manaus
2010

*À Deus, meu consolo
sempre presente na hora
da angústia e a minha
família pela amizade,
amor e compreensão.
Aos homens e mulheres
visionários que pensaram
pela primeira vez em criar
um espaço cybernético
destinado a conter grande
parte do conhecimento
criado pela humanidade a
um toque de “mouse” de
distância, sem eles teria
sido muito mais difícil
escrever esta tese, dedico.*

*A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original.*

*Albert
Einstein*

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu criador, meu salvador, meu pai e minha torre forte, sem ele nada seria possível ou mesmo imaginável;

Ao meu Orientador, Professor José Ferreira da Silva, pela confiança em mim depositada, pela orientação, apoio, incentivo, amizade e conselhos durante dez anos de formação profissional;

À Jânia Lília da Silva Bentes pela cessão do material, dos equipamentos e da estrutura do laboratório de microbiologia; e pelo apoio e amizade inestimável sem o qual eu não conseguiria concluir esta tese;

À amiga Rozana Medeiros Galvão por permitir o uso da estrutura do laboratório de genética e pela orientação e auxílio na fase de extração de DNA e durante grande parte deste trabalho;

Ao amigo Pedro Queiroz Costa Neto pelo grande auxílio nos experimentos, escrita e análise dos resultados, desde a fase inicial até a conclusão da tese;

Ao Professor José Odair Pereira pelo auxílio e incentivo enquanto coordenador do PPGBIOTEC e pela permissão de uso da estrutura do laboratório de princípios bioativos de origem microbiana para a realização dos experimentos;

À professora Maria Teresa Gomes Lopes pela permissão de uso do sistema eletroforético para os experimentos com os marcadores AFLP;

A todos os professores do doutorado e em especial ao Dr. Charles Clement por deixar mais vívido em mim o anseio pelo conhecimento;

Ao Programa Multi Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia;

À CAPES pela concessão da bolsa no início do doutorado;

À Universidade Federal do Amazonas, à Faculdade de Ciências Agrárias e ao Departamento de Produção Animal e Vegetal;

A meus pais Raimunda Elizabeth Souza de Aguiar “*in memoriam*” e José Francisco de Aguiar por me ensinarem o valor da educação; à minha avó-mãe Maria Isabel de Souza que viveu o suficiente para me ver graduada mas não para me acompanhar até aqui; às minhas tias Maria da Conceição, Maria Oneida, Maria de Sant’Anna e Maria da Redenção, a elas meu eterno amor e gratidão; à minha irmã Luana Souza de Aguiar, pela amizade incondicional, amor desmedido e bom humor insuperável que tornam a vida mais fácil;

Ao meu esposo Jucimar Brito de Souza pelo extremo companheirismo, amor e incentivo incondicional, e por me provar que o amor que subsiste às dificuldades se torna muito mais forte;

A meus filhos Ana Elisabete de Aguiar e Souza e Ian Thiago de Aguiar e Souza a caminhada só vale à pena porque vocês estão ao meu lado;

Aos amigos: Expedita Maria Pereira de Oliveira, Marco Antônio Freitas Mendonça e Andréa Zeilmann pelo carinho, amizade e ajuda quando necessário;

Aos amigos do grupo de oração e da Nova Igreja Batista, que com seu apoio e amizade me ajudaram a perseverar nos momentos de dificuldade;

Aos companheiros do Laboratório de Ciência das Plantas Daninhas: Sônia Maria Figueiredo Albertino, Anísia Karla Lima Galvão, Nailson Celso Nina, Giancarlo Oliveira, Odiluz Saldanha e Danilo Paulain pelo auxílio na coleta do material vegetal e durante todo o decorrer dos experimentos;

Ao pessoal dos municípios de coleta: ao professor Valderéz Camilo e ao técnico do IDAM Sr. Maurício, ao Sr. Erasmo e às amigas Alberlane e Aldilane (município de Autazes), ao Técnico agrícola Sr. Garganta (Município de Itacoatiara), ao pecuarista Sr. Adriano Picanço e ao “seu” Mundinho (Município de Parintins) e a todos que de alguma forma me auxiliaram na coleta do material vegetal;

Ao pessoal dos laboratórios de Genética, Microbiologia e Princípios bioativos de origem microbiana;

Aos alunos de iniciação científica que auxiliaram nos experimentos: Anderson Clayton, Milena Miranda e Blenda Naara;

À todos os colegas do doutorado e em especial: Aline, Cristiane, Francisca, Deborah, Themis, Salvador, Gustavo e Ricardo, pelos bons momentos passados juntos;

À Liene pela ajuda no início dos experimentos com AFLP;

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para a conclusão deste trabalho.

AGRADEÇO

RESUMO

A degradação das pastagens é um dos maiores problemas da pecuária, principalmente na Amazônia devido à baixa tecnologia adotada em pequenas propriedades. Em pastagens degradadas ou não, é comum a ocorrência de plantas daninhas, algumas das quais podem ser tóxicas e danosas aos animais. Na região Norte as plantas tóxicas são responsáveis pela maioria das mortes de bovinos adultos, e grande parte destas mortes é causada por *Arrabidaea bilabiata* nas várzeas do rio Amazonas e seus afluentes. Os estudos atualmente conduzidos sobre *A. bilabiata* avaliam principalmente as doses letais e os sintomas de intoxicação em diferentes espécies animais como coelhos, búfalos e bovinos, necessitando estudos mais acurados sobre possíveis diferenças genéticas entre populações geograficamente isoladas, auxiliando no combate às intoxicações e descoberta de possíveis compostos químicos com potencial biotecnológico. O objetivo geral deste trabalho foi estudar a variabilidade genética entre plantas de *A. bilabiata* dos municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins e avaliar o potencial de extratos aquosos e alcoólicos e de *A. bilabiata* no controle de fungos fitopatogênicos *in vitro*. Nos 65 indivíduos analisados por marcadores AFLP, encontrou-se um coeficiente médio de similaridade de 51,39%, com amplitude de 14,28% a 88,50%. As bandas amplificadas pelas quatro combinações de primers variaram de 59 a 85 com uma média de 76 bandas polimórficas, foram amplificadas um total de 309 bandas com uma porcentagem de 98,5% de polimorfismo. As maiores similaridades estão entre indivíduos das mesmas áreas de coleta e variaram de 78,52% a 88,50%. Os menores coeficientes de similaridade encontrados estão entre os indivíduos dos municípios de Autazes e os indivíduos dos municípios de Itacoatiara e Parintins e variaram de 14,28% a 17,08%. Os resultados encontrados neste trabalho podem sugerir que as plantas de *A. bilabiata* possam ter tido uma origem comum há muito tempo atrás, e que com o passar do tempo foram sofrendo seleção, deriva, isolamento geográfico e mutações que as estruturaram em subpopulações. Estudos genéticos em regiões mais amplas, com populações com maior número de indivíduos e com auxílio do estudo da fenologia da espécie e da biologia reprodutiva podem auxiliar na compreensão dos fatores que influenciaram a variação genética existente nos indivíduos analisados. Os marcadores AFLP foram eficientes para caracterizar a variabilidade genética nos 65 indivíduos de *A. bilabiata* analisados. A maior variabilidade em *A. bilabiata* para os locais de coleta estudados está entre os locais de coleta. Houve formação de dois grupos isolados, o primeiro grupo formado pelos indivíduos de Autazes e o segundo com os indivíduos de Itacoatiara e Parintins. A existência de maior variabilidade entre as populações e não dentro delas sugere a existência de baixa taxa de propagação reprodutiva e talvez baixa eficiência na dispersão de sementes e pólen. O extrato aquoso de *A. bilabiata* não demonstrou propriedades fungitóxicas no crescimento micelial de *C. cassicola* mesmo nas concentrações mais elevadas. Para *S. rolfsii* houve redução do tamanho da colônia da ordem de 50% na concentração de 40% de extrato aquoso de *A. bilabiata* em relação à testemunha. O extrato aquoso promoveu redução da esporulação de *C. cassicola* nas concentrações 20 e 40% em 62% e 70 % respectivamente, em relação ao controle. O extrato alcoólico não obteve efeito no crescimento dos fungos testados. A redução de esporulação de *C.*

cassicola mostra o potencial do extrato aquoso de *A. bilabiata* como alternativa de controle biológico, por inibir a formação de esporos do fungo, reduzindo desta forma a quantidade de inóculo do patógeno no campo. Com relação ao fungo *S. rolfsii*, a atividade estimulante na produção de escleródios observada *in vitro*, não indica o uso do extrato de *A. bilabiata* em campo, pois os escleródios são estruturas de resistência e sobrevivência do patógeno extremamente eficientes, dificultando o controle da doença. A coleta das plantas de *A. bilabiata* para a realização dos extratos aquosos e etanólico em diferentes locais impossibilitou atribuir unicamente à menor solubilidade do(s) composto(s) presente(s) no extrato de *A. bilabiata* a inexistência de atividade antifúngica do extrato etanólico nas concentrações testadas neste trabalho, é necessária a realização de experimentos posteriores para esclarecer este aspecto.

Palavras-chave: plantas tóxicas; marcadores moleculares; variação genética inter e intra-populacional; extratos antifúngicos; biotecnologia

ABSTRACT

The grass pasture degradation is one of most serious problems to animal production in Amazonia. Weeds occur on pastures and cause some problems, livestock poisoning is a serious problem. Specially in the north states of Brazil when toxic plants cause large deaths on cattle and the large amount of this deaths is caused by *Arrabidaea bilabiata* in river Amazonas floodplains. Otherwise weeds are potential source of secondary metabolites and another compound with biotechnological potential. Some weeds of *Arrabidaea* are studied for your medicinal, antifungal and toxic activities. *A. bilabiata* extracts were assayed for in vitro activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. and *Candida albicans*. All microbial strains were found to be resistant to the extracts with the exception of *C. albicans*, suggesting a possible antifungal activity. The main goal of this work was to evaluate the genetic variation between *A. bilabiata* from Autazes, Itacoatiara and Parintins (AM) and evaluate in vitro antifungal activity of *A. bilabiata* aqueous and alcoholic extracts on BDA. The four combinations of AFLP markers used yielded 309 bands in 65 analyzed plants, with most (98.5%) being polymorphic, indicating a large level of genetic diversity. The minimum and maximum number of bands per primer was respectively, 59 and 85 bands and the minimum and maximum similarity coefficient was 14,28% and 88,50%. The lower similarity coefficient was chosen between Autazes and Itacoatiara and Parintins plants (14,28% to 17,08%). The greatest genetic variability in Autazes, Itacoatiara and Parintins *A. bilabiata* plants occurred between those places. The UPGMA dendrogram indicate two isolated groups the first one with Autazes plants and the second one with Itacoatiara and Parintins plants together. The results of this study indicate that AFLP markers were efficient in measuring the genetic variability amongst *A. bilabiata* plants and suggest the existence of low reproductive propagation tax and low seed dispersion efficiency. More studies about reproductive biology and seeds dispersion of this specie is valuable to help explain how this specie evolved and create diversification. More studies which large populations can improve more information about which factors contribute to genetic variation in *A. bilabiata*. The aqueous extract of *A. bilabiata* don't show antifungal effect against *C. cassicola*; in *S. rolfsii* it reduces in 50% this fungus species growth on 40% concentration. In *C. cassicola* the aqueous extract reduce in 20% and 40% concentration, 62% and 70% esporulation, respectively. The alcoholic extracts don't show antifungal effect against evaluated fungus. The *C. cassicola* esporulation reduction suggests the aqueous extracts potential in biologic control. For *S. rolfsii* we don't indicate *A. bilabiata* extract because it has stimulated effects on this fungus sclerotium production.

Palavras-chave: toxic plants; molecular markers; genetic variation within an inter-population; antifungal extracts; biotechnology

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** *A. bilabiata* em pastagem dos municípios de Parintins, AM.....16
- Figura 2.** Áreas de ocorrência de *A. bilabiata*.....22
- Figura 3.** Detalhe de um ramo florido de *A. bilabiata* Fonte: Mobot.org.....23
- Figura 4.** Fases da técnica AFLP - (A) clivagem do DNA com enzimas de restrição, (B) ligação dos adaptadores, (C) pré-amplificação, (D) amplificação seletiva...28
- Figura 5.** A - Isolado de *A. Brassicae* B.Sintomas foliares de alternariose.....32
- Figura 6.** Sintomas de antracnose causada por *Coletotrichum guaranicola* em planta jovem de guaraná.....34
- Figura 7.** A-Sintomas de mancha-de-alvo em pepineiro B-Isolado de *C. Cassicola*.....35
- Figura 8.** A - Isolado de *Sclerotium rolfsii*. B - Sintomas de murcha de esclerócio em tomateiro.....36

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Mapa do Estado do Amazonas, destacando os municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins.....42
- Figura 2.** Padrão de DNA genômico de *Arrabidaea bilabiata* amplificado pela técnica de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (AFLP), utilizando duas combinações de *primers* (E+AGC/M+CAT).....50
- Figura 3.** A. Plantas de *Arrabidaea bilabiata* oriundas de estaquia, UFAM. B - Rizoma (caule modificado) de *Arrabidaea bilabiata*, Autazes, AM, setembro de 2008.....53
- Figura 4.** Distância entre os municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins, no Estado do Amazonas.....53
- Figura 5.** A.Ramos com dois e três folíolos em *Arrabidaea bilabiata*. B.heterofilia de folhas em *Arrabidaea bilabiata* - município de Autazes,AM, 2007.....54
- Figura 6.** Localizações dos municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins em relação ao rio Amazonas.....56
- Figura 7.** Agrupamento dos 65 indivíduos de *Arrabidaea bilabiata* dos municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins, AM, através da similaridade genética calculada pelo coeficiente de Jaccard com a análise de agrupamento UPGMA com os *primers* *EcoRI/ MseI* E+ATC/M+CGC, E+AGC/M+CAT, E+AAC/M+CAC e E+AGT/M+CCA com *bootstrap* de 1000 repetições.....57

CAPÍTULO 3

Figura 1. Diâmetro das colônias (crescimento micelial) de *Corynespora cassiicola* e *Sclerotium rolfsii* em meio de cultura com extrato filtrado (EF) de *Arrabidaea bilabiata*.....73

Figura 2. Número de esporos e esclerócios de *Corynespora cassiicola* e *Sclerotium rolfsii* em meio de cultura com extrato filtrado (EF) de *Arrabidaea bilabiata*.....74

Figura 3. Crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* no experimento com extrato alcóolico de *Arrabidaea bilabiata* em diferentes concentrações.....75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Locais de coleta de *Arrabidaea bilabiata* para estudo de variabilidade genética com marcadores AFLP. Manaus, 2010.....42

Tabela 2. Número de *primers* polimórficos em análise molecular de *Arrabidaea bilabiata* oriundas de três municípios do Amazonas. Manaus, 2010.....49

Tabela 3. Maiores e menores coeficientes de similaridades e entre os indivíduos de *Arrabidaea bilabiata*. Manaus, 2010.....52

Tabela 4. Amplitude dos coeficientes de similaridade encontrados em *Arrabidaea bilabiata* nos locais de coleta dos municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins, Amazonas. Manaus, 2010.....55

Tabela 5. Maiores e menores índices de distanciamento genético entre os indivíduos de *Arrabidaea bilabiata*. Manaus, 2010.....55

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Locais de coleta de *Arrabidaea bilabiata* para os experimentos com extratos aquosos e alcóolicos, Manaus, 2010.....64

Tabela 2. Médias do diâmetro das colônias dos fungos fitopatogênicos avaliados quanto ao efeito do extrato aquoso autoclavado (EA) de *Arrabidaea bilabiata* no crescimento micelial. Manaus, 2010.....69

Tabela 3. Produção de esporos de fungos fitopatogênicos avaliados quanto ao efeito do extrato aquoso autoclavado (EA) de *Arrabidaea bilabiata* no crescimento micelial. Manaus, 2010.....70

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
1.1. Plantas tóxicas de pastagens	19
1.1.2. <i>Arrabidaea bilabiata</i>	21
1.2. Marcadores genéticos moleculares	24
1.2.1. Marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)	27
1.3. Uso de extratos de plantas no controle de fitopatógenos.....	29
1.4. <i>Alternaria brassicae</i> (Berk.) Sacc.....	31
1.5. <i>Colletotrichum guaranicola</i> Albuquerque.....	33
1.6. <i>Corynespora asiicola</i> (Berk. & Curt.) Wei	34
1.7. <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.....	36
CAPÍTULO 2. VARIABILIDADE GENÉTICA DETECTADA POR AFLP EM <i>ARRABIDAEA BILABIATA</i> ORIUNDA DE TRÊS MUNICÍPIOS DO AMAZONAS	38
2.1 Introdução.....	39
2.2 Material e Métodos.....	41
2.2.1 Coleta do Material Vegetal	41
2.2.2 Extração de Ácidos Nucleicos	43
2.2.3 Análise de polimorfismos com marcadores AFLP	44
2.2.4 Análise de Resultados	47
2.3 Resultados e Discussão	48
2.4 Conclusões	59
CAPÍTULO 3. TESTE DE EXTRATOS DE <i>A. BILABIATA</i> NO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	60
3.1 Introdução.....	61
3.2 Material e Métodos.....	63
3.2.1 Ensaios com extrato aquoso.....	64
3.2.1.1 Obtenção do extrato aquoso autoclavado	64
3.2.1.2 Obtenção do extrato aquoso filtrado.....	65
3.2.1.3 Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos patógenos dos ensaios com extrato aquoso autoclavado e filtrado	66
3.2.2 Ensaios com extrato etanólico	67

3.2.2.1 Obtenção do extrato etanólico.....	67
3.2.3 Preparo do meio de cultura com os extratos vegetais	67
3.3 Avaliação do crescimento micelial dos patógenos do ensaio com extrato alcóolico.....	68
3.4 Resultados e discussão	68
3.4.1 Ensaio com extratos aquosos.....	68
3.4.1.1 Ensaio com extrato aquoso autoclavado	68
3.4.1.2 Ensaio com extrato aquoso filtrado.....	72
3.4.2 Ensaio com extrato etanólico	75
3.5 Conclusões	79
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 80
Introdução Geral	80
Capítulo 2	88
Capítulo 3	92
Anexos	96

INTRODUÇÃO

O Brasil possui, aproximadamente, 115 milhões de hectares de pastagens cultivadas e 144 milhões de hectares de pastagens nativas, onde predominam centenas de espécies de plantas da vegetação espontânea (VILELA, 2005).

A degradação das pastagens é um dos maiores problemas da pecuária no Brasil. Este fato é ainda mais grave na Amazônia, devido à baixa tecnologia adotada na pecuária em pequenas propriedades. Em pastagens degradadas ou não, é comum a ocorrência de plantas daninhas, algumas das quais podem ser tóxicas e danosas aos animais.

Planta tóxica de interesse pecuário é aquela que quando ingerida pelos animais, em condições naturais, causa danos à saúde ou até mesmo a morte (TOKARNIA et al., 2000). Muitas destas plantas ocorrem nas áreas próximas à floresta, porém quando desmatada ou queimada para a implantação das pastagens passam a infestá-la (HABERMEHL, 1994).

Existem, aproximadamente, 75 espécies de plantas cuja toxicidade foi confirmada em estudos com espécies animais afetadas sob condições naturais. A grande maioria destas espécies somente ocorre no Brasil, outras em países vizinhos e algumas são plantas forrageiras que podem tornar-se tóxicas sob certas condições (TOKARNIA et al., 2002).

No período de 1978 a 1998 no Rio Grande do Sul de 10,6 a 14% dos bovinos, que passaram por exames *post-mortem* morreram devido à ingestão de plantas tóxicas. Considerando um rebanho de 13.000.000 de cabeças e uma taxa de mortalidade de 5 % (650.000 cabeças/ano) morreriam entre 64.000 e 90.000 cabeças/ano. Uma projeção destes dados para a população bovina brasileira indicaria a morte de 800.000 a 1.120.000 cabeças/ano por ingestão de plantas tóxicas, sem considerar que a região Sul tem as menores taxas de mortalidade por ingestão de plantas tóxicas do país (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001).

Além dos prejuízos financeiros causados à pecuária nacional, outra questão importante é o consumo do leite e da carne dos animais intoxicados que é um risco potencial à saúde humana (HABERMEHL, 1994). Há trabalhos

que sugerem que as toxinas podem ser transferidas para os seres humanos através da ingestão de produtos como carne, leite e vísceras dos animais intoxicados (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001), é comum no Estado do Amazonas que os animais intoxicados sejam abatidos e vendidos para o consumo.

Na região Norte a intoxicação por plantas tóxicas é responsável pela maioria das mortes de bovinos adultos, e grande parte destas mortes é causada por *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandwith nas várzeas do rio Amazonas e seus afluentes e por *Paulicourea marcgravii* Aubl. na terra firme (TOKARNIA et al., 2004).

A. bilabiata conhecida como “gibata” ou “chibata” (Figura 1) é a planta tóxica mais importante para herbívoros nas regiões de várzea da Bacia Amazônica e a segunda em importância em toda a região (TOKARNIA et al., 1979). Sob condições naturais, a intoxicação ocorre somente em bovinos (DÖBEREINER et al., 1983; ORTIZ, 2004) e, experimentalmente, por via oral também em coelhos (DÖBEREINER et al., 1984; JABOUR et al., 2006) e búfalos (TOKARNIA et al., 2004).



Figura 1. *Arrabidaea bilabiata* em pastagem do município de Parintins, AM. Foto: Souza, L.

É uma trepadeira escandente pertencente à família Bignoniaceae, abundante nas partes baixas (várzeas e restingas) da Bacia Amazônica, inundadas periodicamente durante a “cheia”; sua toxicidade foi descoberta na Venezuela onde ocorre às margens do rio Orinoco e alguns de seus afluentes. Trata-se de planta que afeta o coração causando morte súbita, seus compostos tóxicos são glicosídeos do tipo esteróides cardioativos (TOKARNIA et al., 2000) e contém ácido monofluoracético ou compostos derivados deste (KREBS et al., 1994; RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001).

Estas plantas, que causam morte súbita, são responsáveis pela metade das mortes causadas por plantas tóxicas (TOKARNIA et al., 2002). A maioria das intoxicações ocorre durante a mudança do gado para a várzea ou da várzea para a terra firme, pois os animais só consomem a espécie em virtude da escassez de forragem que ocorre neste período (TOKARNIA et al., 2000).

Os sintomas de intoxicação aparecem de 6 a 24 horas após a ingestão da planta, os animais caem ou se deitam precipitadamente em decúbito lateral, apresentam movimentos de pedalagem, cerram fortemente as pálpebras berram e morrem. Se o animal for movimentado há piora dos sintomas e aceleração do óbito. Recomenda-se deixar o animal em repouso (TOKARNIA et al., 2007).

Há indicações de que a procedência da planta pode influenciar na toxicidade (JABOUR et al., 2006), porém nenhum estudo foi conduzido para confirmar a alteração da toxicidade em função de fatores ambientais, ou uma possível diferença na toxicidade devida à variabilidade genética entre populações de plantas oriundas de diferentes regiões.

Os estudos conduzidos sobre *A. bilabiata* avaliam as doses letais e os sintomas de intoxicação em diferentes espécies animais como coelhos, búfalos e bovinos (HABERMEHL, 1994; ORTIZ, 2004; TOKARNIA et al., 2004; JABOUR et al., 2006; TOKARNIA et al., 2007) e o teste de extratos em microorganismos (GONZALEZ et al., 2000), necessitando estudos mais acurados, que podem ser úteis na definição de estratégias de controle e também sobre possíveis diferenças genéticas entre populações geograficamente isoladas, auxiliando no combate às intoxicações e descoberta de possíveis compostos químicos com potencial biotecnológico.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a variabilidade genética entre populações de *A. bilabiata* dos municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins e avaliar o potencial de extratos alcoólicos e aquosos desta planta no controle de fungos fitopatogênicos *in vitro*.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Plantas tóxicas de pastagens

O envenenamento por plantas tóxicas é comum em áreas de pastagens infestadas por plantas daninhas, mesmo forrageiras podem causar intoxicação aos animais, algumas plantas podem ter em sua composição metabólitos secundários que podem sofrer alterações no rúmen por ação da flora microbiana podendo causar efeitos adversos, como ocorre em espécies do gênero *Brachiaria*, o consumo destas plantas pode causar intoxicações graves ou mesmo a morte (GONZALEZ et al., 2000).

No Brasil há relatos da ocorrência de 111 plantas tóxicas (RIET-CORREA et al., 2007). As que mais causam intoxicação em bovinos são *P. marcgravii*, em todo o País exceto a região Sul; *Senecio* spp. e *Ateleia glazioviana* Baill. na região Sul; e *Cestrum laevigatum* Schltld. na região Sudeste; e na região Norte *P. marcgravii* na terra firme e *Arrabidaea bilabiata* e *A. japurensis* (DC.) Bureau & K. Schum. nas várzeas e *Brachiaria* spp. em todo o país e principalmente no Centro Oeste (SILVA et al., 2006; TOKARNIA et al., 2004).

Os bovinos estão na América tropical há pouco mais de 500 anos, uma convivência curta quando se trata de relações ecológicas, há plantas presentes no ecossistema de floresta que colonizam pastagens cultivadas em áreas recém-desmatadas, na floresta amazônica existem muitas plantas produtoras de metabólitos secundários, algumas das quais invadem áreas de pastagens e causam intoxicações em ruminantes, como *P. marcgravii*, cujo princípio tóxico (ácido monofluoracético) afeta a função cardíaca e o sistema nervoso, e *A. bilabiata* aparentemente com o mesmo princípio tóxico que causa síndrome paraplégica e necrose hepática (ORTIZ, 2004).

A intoxicação de animais de produção é um problema grave no Brasil, estimativas sugerem que cerca de um milhão de animais morrem anualmente devido a ingestão de plantas tóxicas, além da questão econômica, outro ponto de vista é o sanitário, pesquisas indicam que o consumo de produtos oriundos de animais intoxicados por plantas produtoras de alcalóides pode ser potencialmente perigoso, e que poderia considerar-se o perigo da intoxicação

crônica pelo consumo destes produtos sem a ocorrência de sintomas visíveis (HABERMEHL, 2004).

No Brasil existe um grupo de plantas que causam o efeito conhecido como “morte súbita” (também chamada de “síndrome do gado caído”), uma intoxicação de evolução super aguda que pode ser precipitada ou provocada pelo exercício, estas plantas pertencem a três famílias: Rubiaceae, Bignoniaceae e Malpighiaceae, e algumas delas como *P. marcgravii*, *P. aeneofusca* (Müll. Arg.) Standl., *P. juruana* K. Krause, *P. grandiflora* (Kunth) Standl., *A. bilabiata*, *A. japurensis*, *Mascagnia elegans* (A. Juss.) Griseb. e *M. pubiflora* (A. Juss.) Griseb. afetam o coração (GAVA et al., 1998; HABERMEHL, 1994; ORTIZ, 2004; TOKARNIA et al., 1998).

A transferência de compostos tóxicos ingeridos por animais para seres humanos através do consumo de produtos animais não é rara, além dos animais que sofrem “morte súbita” pode-se considerar ainda animais que ingerem doses sub-letais. Os animais que sofrem intoxicação crônica e têm seus produtos como carne e leite consumidos normalmente podem transferir compostos tóxicos e metabólitos para o leite e contaminar seres humanos. Problemas como esses podem ocorrer em plantas produtoras de alcalóides como as dos gêneros *Senecio*, *Crotalaria*, *Erechtites*, *Heliotropium*, *Echium*, *Trichodesma*, *Cynoglossum* e *Amsinckia* (HABERMEHL, 2004).

A intoxicação de seres humanos pela ingestão de leite de vacas que consumiram pastagens infestadas por *Eupatorium rugosum* Houtt., doença conhecida como enfermidade do leite, causou a morte de várias pessoas (PANTER e JAMES, 1990; JAMES et al., 1994). O consumo de leite e carne de animais intoxicados por *Pteridium aquilinum* (Kaulf.) Brade, conhecida pelo nome vulgar de Samambaia do Campo está em estudo. O consumo desta espécie é considerado responsável por possíveis casos de câncer em seres humanos (ALONSO-AMELOT e AVEDANO, 2001), pois seus princípios ativos são neoplásicos e secretados no leite, e podem ser depositados nos tecidos musculares dos animais (ALONSO-AMELOT et al., 1996; MARÇAL, 2003; VETTER, 2009).

Na Austrália houve intoxicação de cães que consumiram medula óssea de pássaros, que ingeriam sementes de plantas contendo ácido

monofluoracético. Muitos pássaros nativos daquele país são resistentes a plantas com alto teor deste ácido (SEAWRIGHT, 1994). No Brasil, *A. bilabiata*, *P. marcgravii* e outras 11 espécies de plantas dos gêneros *Palicourea*, *Mascagnia*, *Arrabidaea* e *Pseudocalymma*, pertencentes ao grupo que causa morte súbita (TOKARNIA et al., 1990) contém ácido monofluoracético ou compostos derivados.

No Brasil é comum que a carne de animais acometidos de “morte súbita” seja consumida normalmente. (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001).

1.1.1. *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandwith

A família Bignoniaceae possui aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies de plantas (POSER et al., 2000), esse taxon possui espécies distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo (PAULETTI et al., 2003); o gênero *Arrabidaea* ocorre na América tropical, do sul do México ao Brasil central (COSTA e LIMA, 1989), neste gênero existem algumas espécies tóxicas para bovinos, dentre elas *A. bilabiata*, conhecida pelos nomes populares de “chibata” ou “gibata”, classificada no grupo das plantas que causam “morte súbita” (JABOUR et al., 2006). Exsicatas depositadas no “Missouri Botanical Gardens” fazem referência a coletas desta espécie na Bolívia, Brasil (Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Roraima); Colômbia; Guiana Francesa; Guiana; Peru; Suriname e Venezuela (Figura 2).

NAD83 5.00000°S 53.00000°W; UTM 22 278247E 46999N

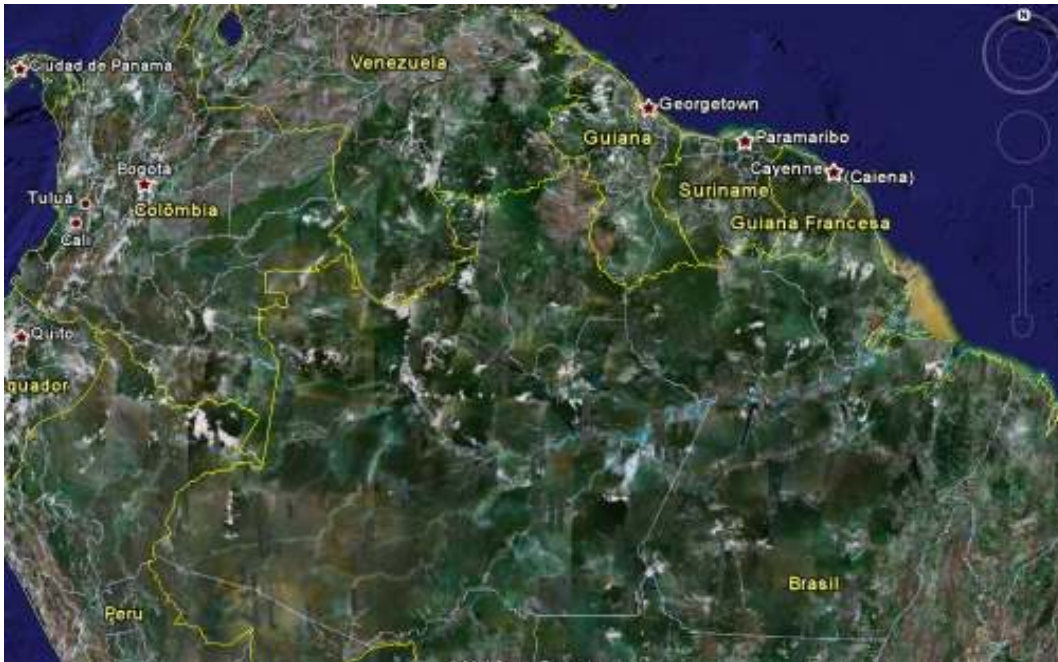


Figura 2. Áreas de ocorrência de *Arrabidaea bilabiata*. imagem:Google Earth.

A. bilabiata é uma trepadeira, liana ou arbusto escandente. Ocorre em pântanos e áreas sazonalmente inundadas na Venezuela, às margens do rio Orinoco, e nas várzeas do rio Amazonas e seus afluentes (CAUPER, 2006; TOKARNIA et al., 2000).

Possui ramos cilíndricos, acinzentados; glabros e lenticelosos. Folhas pecioladas, com o folíolo terminal transformado em gavinha simples, glabra; folíolo elítico ou ovado elítico; ápice agudo ou curto acuminado, base arredondada ou assimétrica. Inflorescência em racemos axilares, curtos, com 7-15 flores; flores brancas com uma bráctea paleácea envolvendo o cálice; cálice bilobado; corola campanulada, infundibuliforme, externamente esparsamente tomentosa; fruto cápsula alongada deiscente, superfície lisa, com uma nervura proeminente na região mediana, no sentido longitudinal do fruto; sementes achatadas, suborbiculares aladas; ala estreita, coriácea, castanha, pouco diferenciada do corpo da semente (CAUPER, 2006) (Figura 3).

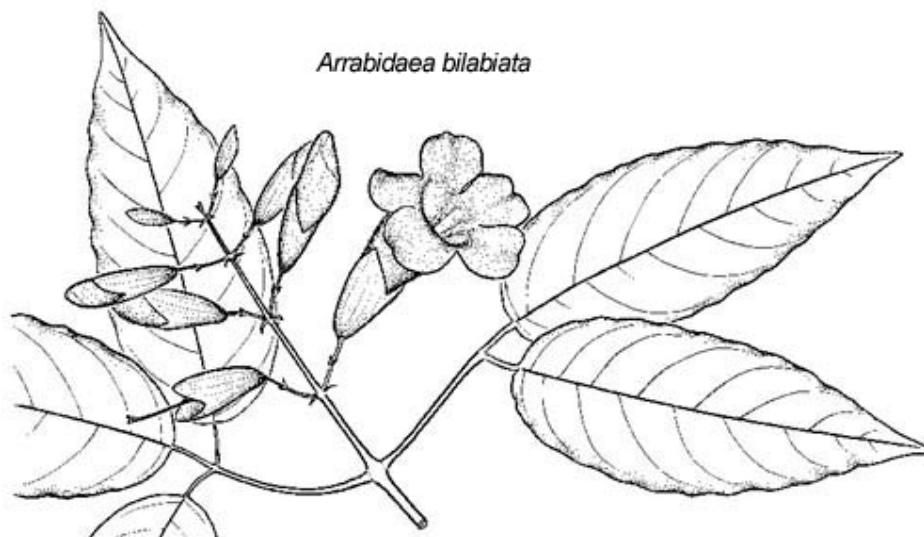


Figura 3. Detalhe de um ramo florido de *Arrabidaea bilabiata*.

Imagem: Mobot.org. Disponível em: <http://www.mobot.org/mobot/research/ven-guayana/bignoniaceae/image/arrbila.jpg>. Consultada em: 02/05/2006.

Trabalhos publicados referem-se a esta planta como causadora de “morte súbita em bovinos”, nas áreas de várzea do rio Amazonas e seus afluentes (GAVA et al., 1998; GONZALEZ et al., 2000; RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001; TOKARNIA et al., 2002; HARAGUCHI, 2003; TOKARNIA et al., 2004; JABOUR et al., 2006), há referências também na Venezuela e no Suriname como planta medicinal com uso antidiarreico, afrodisíaco e na melhoria da saúde geral (VAN ANDEL et al., 2007; VAN ANDEL e HAVINGA, 2008).

A. bilabiata causou intoxicação aguda comprovada, experimentalmente, em bovinos, coelhos e búfalos. Os sintomas de intoxicação descritos na literatura para todas as espécies testadas foram desequilíbrio, tremores musculares, debatimento, queda em decúbito lateral ou esternal, movimentos de pedalagem, dispnéia acentuada e respiração ofegante que pode evoluir para morte ou não, o exercício costuma acelerar os sintomas (JABOUR et al., 2006; TOKARNIA et al., 2004).

As primeiras referências ao princípio tóxico desta espécie foram relatadas por Tokarnia et al. (1979) que fez referência à presença de

esteróides cardioativos, posteriormente foi identificado nesta espécie o ácido monofluoracético (KREBS et al., 1994; RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001).

O ácido monofluoracético é um composto pouco presente em plantas, pois é rara a presença de compostos com átomos de halogênio em plantas angiospermas. Este ácido compete com o ácido acético na transição entre a glicólise e o ciclo de Krebs, o que impede a continuação das vias bioquímicas da respiração e leva à formação de ácido cítrico. O animal intoxicado morre rapidamente por um processo de asfixia celular (IB-USP, 2007). O ácido monofluoracético inibe o ciclo de Krebs mesmo em baixas concentrações e é tóxico para todos os seres vivos, a dose letal para seres humanos está entre 2 e 5 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo (HARBONE e BAXTER, 1995).

1.2. Marcadores genéticos moleculares

São considerados marcadores genéticos quaisquer características morfológicas ou moleculares que diferenciem indivíduos, e que sejam facilmente detectáveis.

Marcadores genéticos permitem aferir informações sobre diversidade genética entre populações de plantas, até a década de 60 do século passado os estudos de genética e melhoramento eram conduzidos com marcadores associados a caracteres morfológicos, que eram controlados por genes associados a características fenotípicas de fácil identificação visual, como nanismo, deficiência clorofítica, cor de pétala ou morfologia foliar (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Marcadores morfológicos como estes estão sujeitos aos efeitos da interação genótipo-ambiente que interferem na expressão fenotípica (PEREIRA et al., 2008).

Outros marcadores associados a estudos em plantas são os marcadores bioquímicos ou isoenzimáticos, que se baseiam no produto na expressão do DNA como proteína. Dentre as vantagens do uso de marcadores bioquímicos estão: a obtenção de resultados rápidos (24 a 48 horas) e facilidade da técnica (VIEIRA et al., 2009). A variação genética nesta técnica é avaliada através de eletroforese de diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, que

ocorrem em uma mesma espécie e têm afinidade por um mesmo substrato (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), é considerada uma técnica de baixo custo e que tem ótimos resultados onde os polimorfismos enzimáticos se aproximam mais da expressão fenotípica final, pois são um produto intermediário da expressão do gene (TORGGLER et al., 1995). A desvantagem dos marcadores isoenzimáticos é que como os marcadores morfológicos eles sofrem influência ambiental (SALLA et al., 2002).

Os marcadores isoenzimáticos são de caráter co-dominante, possibilitando a separação de genótipos homozigotos e heterozigotos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Marcadores bioquímicos ainda são usados em estudos de seleção assistida por marcadores, variabilidade e caracterização de cultivares (YANAKA et al., 2005; AREIAS et al., 2006; MALONE et al., 2007; ROSSITER et al., 2008; VIEIRA et al., 2009).

Com o surgimento da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction* - reação de polimerase em cadeia) e com o advento de outras técnicas modernas de biologia molecular na década de 80 o polimorfismo genético passou a ser detectado diretamente no DNA, aumentando a facilidade na geração de dados e o número de locos e indivíduos amostrados, os marcadores moleculares combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre sequências complementares de DNA ou pela técnica de PCR, trazem vantagens como: serem praticamente ilimitados em número, de fácil detecção, serem herdáveis e não serem afetados pelo meio ambiente (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados e por isso são usados para estudos de genética de populações, mapeamento, análises de similaridade e distância genética (LOPES et al., 2003) e também para análise de fluxo gênico (ADIN et al., 2004).

Os tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade em nível de DNA, variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade, marcadores gerados por técnicas como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - Polimorfismo

de DNA Amplificado ao Acaso), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados) são usados em vários estudos genéticos em plantas, animais e micro-organismos.

Na técnica RFLP o DNA total do indivíduo é isolado e clivado com enzimas de restrição, os fragmentos resultantes são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana de celulose ou náilon. Em seguida, é feita a detecção dos fragmentos específicos pela incubação da membrana com uma sonda (sequência de DNA normalmente da própria espécie em estudo) previamente marcada (radioatividade ou a frio), cujas bases complementares se pareiam com um ou mais fragmentos contidos na membrana. A posição onde a sonda se hibridiza pode ser detectada por autorradiografia. O polimorfismo ocorre por variações nas sequências primárias dos sítios de restrição ou na mudança de suas posições devido a inserções e/ou deleções. É uma técnica com grande número de etapas, e o uso de sondas radioativas dificulta o seu uso (ALZATE-MARIN et al., 2005).

O polimorfismo na técnica RAPD é revelado pela amplificação de locos cromossômicos usando-se *primers* compostos de sequências curtas de cerca de dez oligonucleotídeos (LOPES et al., 2003). O tamanho do *primer* faz com que ele quando submetido a condições ideais de temperatura (37 a 42° C) se pareie em vários pontos do genoma. Se existirem duas sequências complementares no genoma, em direções opostas a uma distância máxima entre si de 3000 pares de nucleotídeos, ocorre a amplificação da região. O tamanho pequeno do *primer* permite que ele encontre várias regiões complementares no genoma e amplifique vários locos. É uma técnica que não exige conhecimento prévio da sequência a ser amplificada. Após a amplificação os fragmentos são separados em um gel de poliacrilamida ou agarose, corados com nitrato de prata ou brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra violeta (LOPES et al., 2003; ALZATE-MARIN et al., 2005).

Esta técnica tem auxiliado na detecção de variabilidade em diversos grupos de plantas (SALLA et al., 2002), porém a desvantagem da técnica RAPD consiste na baixa reprodutibilidade da técnica, pois é necessário um cuidado

criterioso nas condições da reação no termociclador e demais passos da técnica como o preparo das reações, a qualidade do DNA e a concentração de íons magnésio e da Taq polimerase (LOPES et al., 2003; ALZATE-MARIN et al., 2005).

Os marcadores gerados pela técnica de AFLP (VOS et al.,1995), combinam os polimorfismos gerados por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR (OLIVEIRA et al., 2005).

1.2.1.Marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)

Dentre os marcadores moleculares disponíveis atualmente, a técnica AFLP (VOS et al.,1995) mostrou-se eficiente para análise de variabilidade genética (SOUSA et al., 2007). O AFLP baseia-se no corte do DNA do organismo por enzimas de restrição sem conhecimento prévio do genoma desse organismo (LOPES et al., 2003; BONIN, EHRICH e MANEL, 2007). A técnica de AFLP supera muitas das limitações dos outros marcadores moleculares, como RAPD e RFLP, pois revela mais polimorfismo do que tais técnicas e permite que um maior número de loci seja amostrado em um único ensaio (10-50 locos polimórficos) (GIMENES, LOPES e VALLS, 2002), gerando marcadores altamente reprodutíveis que também são considerados locos específicos dentro de uma determinada espécie (SINGH et al., 2010).

O DNA total da planta é clivado por enzimas de restrição de corte raro e frequente, gerando um número alto de fragmentos detectados por eletroforese. Posteriormente são ligados adaptadores (pequenas sequências de DNA) às extremidades desses fragmentos, esses adaptadores se anelarão com *primers* específicos em duas fases de PCR denominadas pré-amplificação e amplificação seletiva (Figura 4).

No final do processo os fragmentos resultantes são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; OLIVEIRA et al., 2005;). A presença ou ausência destes nucleotídeos seletivos nos fragmentos genômicos amplificados são a base para revelação do polimorfismo (MURTAZA, 2006).

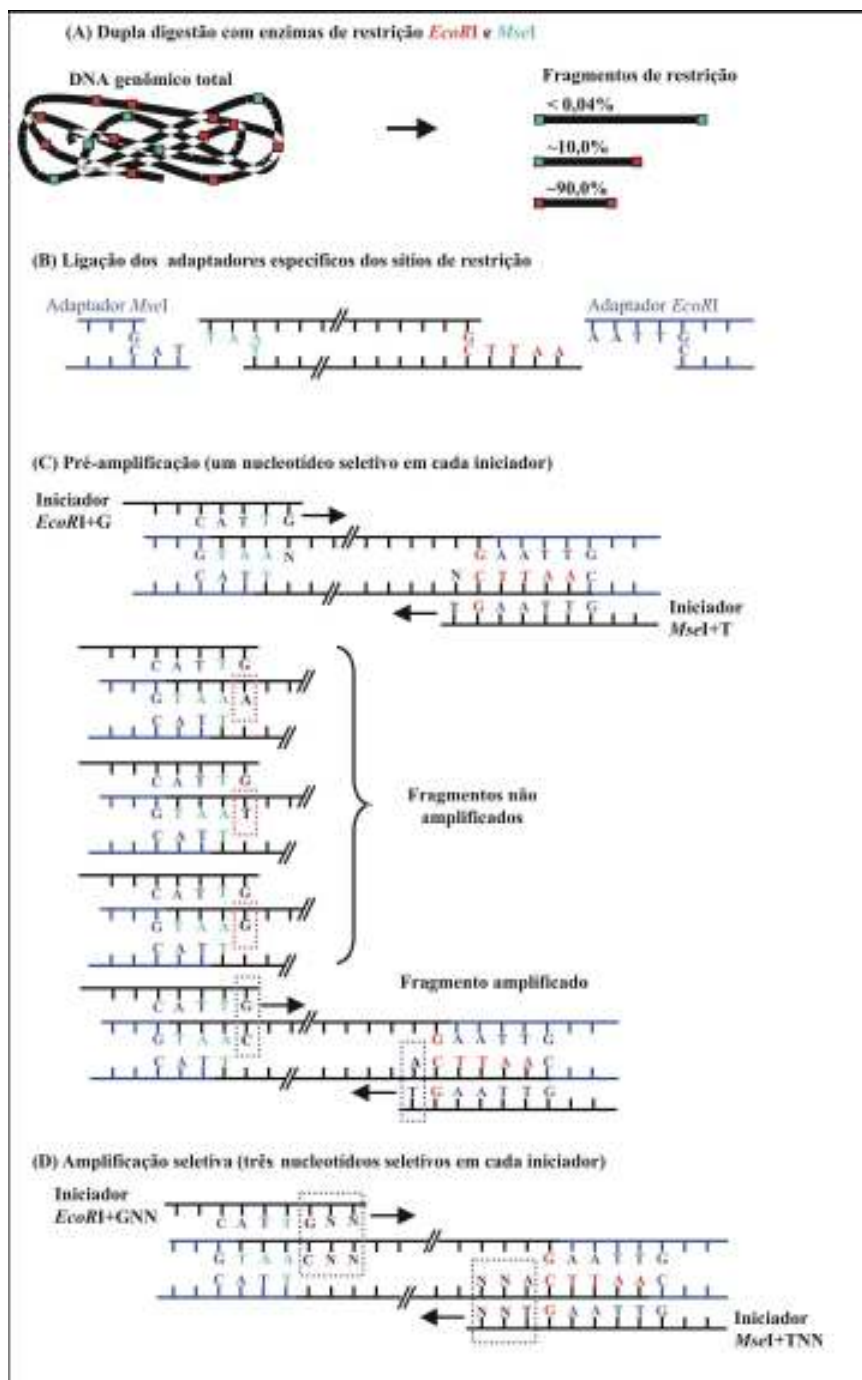


Figura 4. Fases da técnica Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados - (A) clivagem do DNA com enzimas de restrição, (B) ligação dos adaptadores, (C) pré-amplificação, (D) amplificação seletiva. Imagem: Lopes et al., 2003.

Uma limitação da técnica AFLP é a maior quantidade de reagentes (enzimas de restrição, adaptadores e *primers* específicos) e equipamentos de

biologia molecular necessários para implementar a técnica, o DNA requerido deve ser mais puro, o que requer protocolos de extração mais elaborados, o AFLP é considerado uma técnica menos acessível em comparação com os marcadores RAPD (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica AFLP já foi usada para estudos de diversidade genética em espécies cultivadas como acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) (SALLA et al., 2002); alface (*Lactuca sativa* L.) (SOUSA et al., 2007); algodão (*Gossypium hirsutum* L. e *G. arboreum* L.) (MURTAZA, 2006); 19 espécies de *Arachis sp.* (GIMENES, LOPES e VALLS, 2002); arroz (*Oryza sativa* L.) (ARNAO et al., 2008); citros: limão Cravo (*Citrus limonia* (L.) Osbeck), tangerina Sunki (*C. sunki* hort. ex Tanaka), tangerina Cleópatra (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e citrumelo Swingle (*C. paradise* x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (ANDRADE et al., 2007); gergelim (*Sesamum indicum* L.) (ALI, YASUMOTO e SEKI-KATSUTA, 2007); mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (MUHLEN, MARTINS e ANDO, 2000); maracujá doce (*Passiflora alata* Curtis) (BELLON et al., 2009); soja (*Glycine Max* (L.) Merr.) (SINGH et al., 2010); tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (ZHANG et al., 2008) e plantas daninhas como proso millet (*Panicum miliaceum*, L.) (KARAN et al., 2004); amora gigante (*Rubus alceifolius* Poir.) (AMSELLEM et al., 2000); cardo selvagem (*Onopordum thistles*) (O'HANLON et al., 1999); capim bode (*Aegilops cylindrica* Host.) (PESTER et al., 2003).

1.3. Uso de extratos de plantas no controle de fitopatógenos

A produção agrícola pode ser afetada por fatores que comprometem a produção como a ocorrência de pragas, doenças e plantas daninhas. Para reduzir o prejuízo causado por pragas e doenças às plantações são usados métodos de controle físico, químico e biológico (RIBEIRO e BEDENDO, 1999).

Os danos provocados por pragas e doenças têm assolado os cultivos agrícolas desde o início da agricultura, para os agricultores combaterem as pragas e doenças é uma necessidade. Geralmente, a tomada de decisão, quanto ao método de controle é tomada pelo agricultor, porém muitas vezes

a ocorrência de uma praga ou doença pode ameaçar propriedades vizinhas, localidades próximas e algumas vezes até localidades distantes (FAO, 2001).

As perdas causadas por pragas e doenças na agricultura têm sido estimadas em cerca de 50% de tudo o que é produzido, muitas dessas perdas são causadas por infecções fúngicas e bacterianas. Isto é mais preocupante em países em desenvolvimento (MAGRO et al., 2006) onde causa o aumento do preço dos alimentos produzidos e dificulta o acesso alimentar às parcelas mais carentes da população.

Alternativas ao uso de agrotóxicos têm surgido no controle de doenças e pragas de plantas como: controle biológico com uso de microorganismos antagônicos ou parasitas; aplicação de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência, e também as plantas que produzem metabólitos e que através da elaboração de extratos podem atuar no controle de doenças de plantas (KUHN et al., 2006).

A agricultura moderna tem aumentado a produtividade por meio de outras técnicas, do uso de produtos tóxicos para o controle de pragas e doenças de plantas (BONALDO et al., 2004), a busca de substitutos para estes produtos tóxicos tem feito avanços com extratos vegetais e óleos essenciais (SOUZA et al., 2007) e algumas pesquisas têm tido sucesso com o uso de extratos vegetais no controle de fitopatógenos (RIBEIRO e BEDENDO, 1999; CUNICO et al., 2002; BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004; AMARAL e BARA, 2005; ROZWALKA et al., 2008).

Cerca de 99,6% das plantas da flora brasileira têm sua composição química quase desconhecida, aproximadamente 40 a 55 mil espécies (SILVA et al., 2005), e muitos compostos secundários de plantas tóxicas e medicinais já isolados e com estrutura química determinada, ainda não foram estudados quanto às suas atividades biológicas. Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias como: alcalóides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides entre outras (STANGARLIN et al., 1999).

Muitas plantas são fonte de metabólitos secundários, nos vegetais estes compostos atuam na diferenciação celular, regulação do crescimento, a mediação das interações entre plantas e outros organismos e, principalmente,

proteção (RODRIGUES et al., 2007). São compostos como os isolados de diferentes famílias vegetais: glicosídeos cianogênicos, poliacetilenos, alcalóides e compostos fenólicos, além de metabólitos como os polietenos encontrados em *Tagetes* sp., isotiocianatos e glicosinolatos em *Brassica* sp. e outros (VERPOORTE e MEMELINK, 2002; TAIZ e ZEIGER, 2004; DIXON, 2005).

Porém, muitas plantas apresentem propriedades químicas que permitam seu uso como ferramenta de controle alternativo, mais trabalhos fazem referência ao controle de insetos, e somente uma pequena parcela ao uso de extratos de plantas e óleos essenciais para o controle de fitopatógenos (BOWERS e LOCKE, 2000), o que precisa ser mais investigado. A literatura faz referência a espécies com atividade fungitóxica em seus extratos como: alho (*Allium sativum* L.) (SOUZA et al., 2007), hortelã (*Mentha piperita* L.) (RIBEIRO e BEDENDO, 1999), pimenta (*Capsicum* sp.) (SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN e CRUZ, 2000) e mamona (*Ricinus communis* L.) (TEQUIDA-MENESES et al., 2002).

Alguns fungos fitopatogênicos causadores de doenças em cultivos agrícolas têm sido escolhidos como alvo para os testes de extratos vegetais, como os fungos dos gêneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Corynespora* e *Sclerotium* escolhidos por destacar-se e causar prejuízos em cultivos agrícolas importantes em algumas regiões, no Estado do Amazonas as culturas anuais como as hortaliças e algumas fruteiras perenes como o guaranazeiro são atacadas severamente por fungos fitopatogênicos destes gêneros.

1.4. *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc.

As alternarioses são doenças fúngicas causadas pelos fungos do gênero *Alternaria* e estão entre as doenças mais comuns em hortaliças como as solanáceas, apiáceas, aliáceas, crucíferas, cucurbitáceas e chicoriáceas (TÖFOLI e DOMINGUES, 2006). As perdas econômicas causadas por fungos do gênero *Alternaria* em diversos hospedeiros estão entre as maiores causadas por qualquer patógeno (AGRIOS, 2005).

Dentre os fungos do gênero *Alternaria* que causam doenças em plantas cultivadas está a espécie *A. brassicae* que ataca culturas comerciais como o

brócolis (*Brassica oleracea* var. *itálica* Plenck.), a couve (*Brassica oleracea* L.), a couve flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) e o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Couve e repolho são duas hortaliças cultivadas nas várzeas do Estado do Amazonas, a alternariose em brássicas é causada pelo fungo *A. brassicae* e em períodos de alta umidade relativa do ar pode causar perdas de até 50% a essas culturas (PERUCH, MICHEREFF e ARAUJO, 2006).

Os sintomas da alternariose iniciam em folhas mais velhas e depois evoluem para as partes mais novas das plantas, a doença causa grandes prejuízos em condições de altas temperaturas e umidade, os sintomas foliares são lesões necróticas, circulares ou não, pardo escuras, com anéis concêntricos e bordas bem definidas (Figura 5). A alta severidade da doença ocasiona intensa redução da área foliar, queda do vigor das plantas, quebra de hastes, depreciação de frutos e tubérculos e morte de plantas, com redução da produção e da qualidade (TÖFOLI e DOMINGUES, 2006).

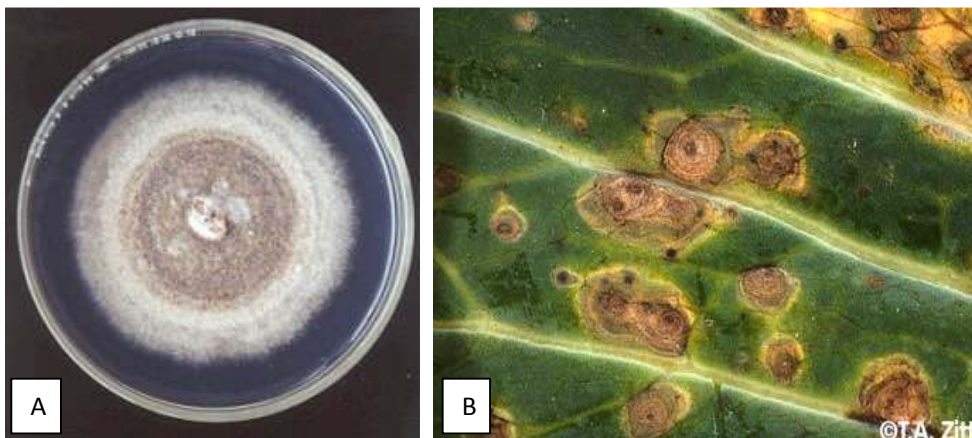


Figura 5. A. Isolado de *Alternaria brassicae*.

Foto: http://www.biotec.or.th/tbcc/dbstore/pic/DOAC_0191.jpg. Acessado em: 22/09/2010. B. Sintomas foliares de alternariose.

Foto: http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/Images/Impt_Diseases/34_Crucifer_Alt er.jpg. Acessado em: 22/09/2010.

O controle da alternariose baseia-se na aplicação de fungicidas à base de clorotalonil, mancozeb ou oxicloreto de cobre, preventivamente ou após o surgimento dos primeiros sintomas (MICHEREFF et al., 2003).

O surgimento de fungos resistentes, a busca de alternativas ao uso intensivo de fungicidas e insumos químicos na agricultura, o crescimento da

produção de hortaliças orgânicas e o anseio por práticas mais sustentáveis na agricultura vêm despertando para a busca de compostos de origem vegetal como os extratos de plantas que podem auxiliar no controle de doenças causadas por fungos como a alternariose.

1.5. *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque.

O fungo *C. guaranicola* pertence ao gênero *Colletotrichum* e causa doenças conhecidas como antracnose em várias espécies cultivadas como cereais e gramíneas (*C. graminicola* (Ces.) Wils.), cucurbitáceas (*C. lagenarium* (Pass.) Ells & Halst), morango (*C. acutatum* Simmonds), e cana de açúcar (*C. falcatum* Went.) e a antracnose do guaranazeiro (*C. guaranicola* Albuquerque.).

O Brasil é o único produtor comercial de guaraná (*Paulinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) no mundo, porém apesar do guaraná encontrar mercado propício e ser uma boa alternativa para a diversificação dos cultivos em pequenas propriedades a sua produção no Estado do Amazonas é limitada pela antracnose, doença fúngica causada pelo fungo *C. guaranicola* considerada a doença mais séria desta cultura (BENTES e MATSUOKA, 2002; BENTES e BARRETO, 2004).

A antracnose tem sido apontada como causa da redução na área cultivada com guaraná no Estado do Amazonas e pode levar a uma redução de até 88% em plantações cultivadas da maneira tradicional, inviabilizando o cultivo do guaranazeiro pelos agricultores (MILEO et al., 2007).

A antracnose ataca o guaranazeiro em qualquer fase de desenvolvimento ocasionando grandes perdas, o fungo causa vários sintomas nas plantas atacadas: crestamento em folhas jovens com queda posterior (Figura 6), em folhas em crescimento antes da maturidade causa lesões necróticas de formato variável, que causam deformações e enrolamento das folhas, mais crítico quando atingem as nervuras. Ataques sucessivos causam morte descendente dos ramos e conseqüente morte da planta (EMBRAPA, 2006).



Figura 6. Sintomas de antracnose causada por *Coletotrichum guaranicola* em planta jovem de guaraná. foto: <http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/FI000122.aspx>

Os métodos de controle recomendados são uso de clones resistentes, aplicação de fungicidas e podas de limpeza para redução da severidade (EMBRAPA, 2006). Muitos produtores de guaraná são agricultores familiares com pequenas propriedades no interior do Amazonas, em municípios como Maués, distantes da capital do Estado, sem acesso aos clones resistentes e aos fungicidas comerciais, a existência de métodos de controle alternativo como extratos vegetais poderia ser uma ferramenta a mais no manejo dos guaranazais do Estado do Amazonas.

1.6. *Corynespora asiicola* (Berk. & Curt.) Wei

O fungo *Corynespora asiicola* causador da mancha-alvo tem colônia de coloração cinza ou marrom-clara em meio de cultura. Os conidióforos são longos, de coloração geralmente marrom-clara. Os esporos (conídios) são formados sozinhos ou em cadeias de dois a seis, retos ou levemente curvados, cilíndricos, lisos com coloração de subhialina a marrom-claro com quatro a 20 pseudo septos e um hilo pronunciado na base (BLAZQUEZ, 1991).

C. asiicola é uma espécie de fungo cosmopolita e inespecífica, comum e abundante, agente causal da doença mancha alvo ou mancha de corinéspora

em mais de 70 hospedeiros em regiões tropicais e sub-tropicais (Figura 7) (OLIVEIRA et al., 2007).



Figura 7. A - Sintomas de mancha-de-alvo em pepineiro. Foto: <http://www.ipmimages.org/images/768x512/1563097.jpg>
B - Isolado de *Corynespora cassiicola*. Foto: http://www.biotec.or.th/tnc/dbstore/pic/DOAC_0126.jpg.
Consultado em: 20/08/2010.

No Brasil já foi relatado causando doença em algumas culturas como: alface (*Lactuca sativa* L.) (SANTOS et al., 2007); mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.) (VERZIGNASSI, POLTRONIERI e BENCHIMOL, 2009); soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (SOARES, GODOY e OLIVEIRA, 2009) e pepino (*Cucumis sativus* L.) (VERZIGNASSI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006); a capacidade de infectar vários hospedeiros distintos demonstra a patogenicidade desse fungo (OLIVEIRA et al., 2007).

O pepino japonês é uma das hortaliças que possui alta suscetibilidade à *C. cassiicola*, a literatura informa perdas de até 60% da produção em cultivos afetados (UEDA et al., 2008). As principais medidas de controle adotadas ainda são o controle químico e a substituição de variedades suscetíveis (VERZIGNASSI et al., 2003) A preocupação com o destino de agrotóxicos no meio ambiente e a alta procura que o pepino japonês tem no mercado são dois motivos para o teste de métodos de controle alternativo como o uso de extratos vegetais.

1.7. *Sclerotium rolfsii* Sacc.

O fungo *Sclerotium rolfsii*, agente causal da murcha-de-esclerócio, possui corpos de frutificação assexuais e esporos ausentes, formando esclerócios escuros, marrons ou pretos, globosos ou irregulares e compactos, com micélio septado, branco sobre os quais visualizam-se os esclerócios (Figura 8) (AGRIOS, 2005).

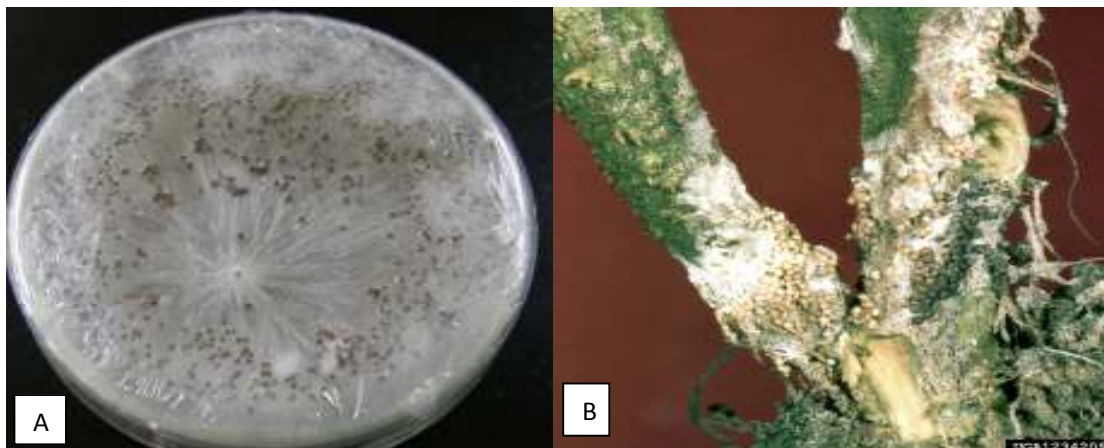


Figura 8. A - Isolado de *Sclerotium rolfsii*. Foto: Castro, M. B - Sintomas de murcha de esclerócio em tomateiro. Foto: Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series, <http://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1234209> Consultado em: 20/08/2010.

A podridão de escleródio, murcha-de-escleródio ou murcha-de-esclerócio afeta várias espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas e culturas agrícolas, com cerca de 500 espécies botânicas como hospedeiros (MAFIA, ALFENAS e RESENDE JÚNIOR, 2007), causa tombamento de plantas em mudas e podridão do colo e raízes em plantas adultas, o que resulta em murcha e pode levar à morte da planta. Este fungo está amplamente distribuído pelas regiões tropicais e subtropicais, se desenvolve melhor com alta umidade relativa do ar e temperaturas em torno de 27 °C (MARTINS et al., 2003). Trata-se de patógeno de difícil controle pela sua capacidade de sobreviver no solo por um longo período (SERRA e SILVA, 2005; MAFIA, ALFENAS e RESENDE JÚNIOR, 2007), causando maior severidade em locais com climas quentes e úmidos e regiões tropicais e sub-tropicais em comparação com regiões temperadas (YAQUB e SHAZAH, 2006).

A melhor estratégia de controle é o manejo integrado que visa diminuir a fonte de inóculo do patógeno no campo, para muitas culturas de baixo valor econômico e regiões isoladas o controle químico é inviável economicamente (MARTINS et al., 2003). Neste escopo o uso de extratos vegetais com efetividade no controle deste patógeno pode contribuir para a diminuição de plantas doentes e da quantidade de inóculo no campo, auxiliando na diminuição da severidade da doença em cultivos subseqüentes.

Capítulo 2. VARIABILIDADE GENÉTICA DETECTADA POR AFLP EM *Arrabidaea bilabiata*

RESUMO

Plantas tóxicas de pastagens causam intoxicação em animais de produção quando ingeridas em regime de campo; nas várzeas da região Amazônica *A. bilabiata* é responsável pela maioria das intoxicações, sua ingestão é a maior causa de morte em animais adultos depois da fome durante as enchentes. Pouco se conhece sobre a biologia desta espécie e nenhuma referência foi encontrada sobre métodos de propagação; diferenças genéticas entre populações de plantas isoladas podem ser um fator ligado à variação de toxicidade em experimentos realizados com plantas de diferentes municípios da Amazônia. A técnica de Marcadores AFLP é usada no estudo de polimorfismo genético em populações, com vantagens como: capacidade de detecção de múltiplos locos por reação e repetibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre plantas de *A. bilabiata* coletadas em áreas de várzea de três municípios do Amazonas, com marcadores AFLPs e estimar a distância genética entre os indivíduos da espécie estudada. Nos 65 indivíduos analisados, o coeficiente médio de similaridade foi de 51,39%, com amplitude de 14,28 a 88,50%. As bandas amplificadas pelas quatro combinações de primers variaram de 59 a 85 com uma média de 76 bandas polimórficas, num total de 309 bandas com uma porcentagem de 98,5% de polimorfismo. As maiores similaridades variaram de 78,52 a 88,50%. Os menores coeficientes de similaridade encontrados estão entre os indivíduos dos municípios de Autazes e os indivíduos dos municípios de Itacoatiara e Parintins e variaram de 14,28 a 17,08%. Os resultados encontrados neste trabalho podem sugerir que as plantas de *A. bilabiata* possam ter tido uma origem comum há muito tempo atrás, e que com o passar do tempo foram sofrendo deriva, seleção, isolamento geográfico e mutações que as estruturaram em subpopulações. Estudos genéticos em regiões mais amplas, com populações com maior número de indivíduos e com auxílio do estudo da fenologia da espécie e da biologia reprodutiva podem auxiliar na compreensão dos fatores que influenciaram a variação genética existente nos indivíduos analisados. Os marcadores AFLP foram eficientes para caracterizar a variabilidade genética nos 65 indivíduos analisados. Houve formação de dois grupos isolados, o primeiro grupo formado pelos indivíduos de Autazes e o segundo com os indivíduos de Itacoatiara e Parintins. A existência de maior variabilidade entre as populações e não dentro delas sugere a existência de baixa taxa de propagação reprodutiva e talvez baixa eficiência na dispersão de sementes e pólen.

Palavras-chave: plantas tóxicas; variação genética inter e intra-populacional; marcadores moleculares; similaridade genética; distância genética

2.1 INTRODUÇÃO

Plantas tóxicas de pastagens são aquelas que causam intoxicação em animais de produção quando ingeridas em regime de campo; nas várzeas da região Amazônica a planta responsável pela maioria das intoxicações é *A. bilabiata*, sua ingestão é a maior causa de morte em animais adultos depois da fome ocasionada pelas enchentes (TOKARNIA et al., 2000).

Plantas que possuem metabólitos secundários tóxicos com atividade comprovada como *Arrabidaea bilabiata*, podem ser alvo de estudos ou *screenings* quanto à possíveis outros usos destes compostos, seja na indústria farmacêutica ou biotecnológica.

Algumas plantas tóxicas podem possuir ativos com atividade farmacêutica ou outro tipo de atividade desconhecida pelo homem, dentre estas plantas estão plantas tóxicas para o gado como *P. marcgravii* e *A. bilabiata* ambas contém ácido monofluoracético em sua composição; outras plantas como *Hibiscus rosa-sinensis* L. (papoula), *Aristolochia trilobata* L. (calunga), *Bactris gasipaes* Kunth (pupunha), *Astrocaryum aculeatum* G. Mey. (tucumã) e *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanha do Brasil) já tiveram suas propriedades farmacológicas e nutricionais estudadas e são alguns exemplos de como a rica flora amazônica pode contribuir para o desenvolvimento de produtos em biotecnologia (FONTANA et al., 2000).

A. bilabiata é uma planta originária dos ambientes de várzea às margens dos rios e paranás do rio Amazonas. Tais ambientes, muitas vezes, são usados pelo homem para a formação de pastagens, e sofrem perturbações que alteram a comunidade de plantas presentes no local como capina, roçagem, aplicação de herbicidas e queimadas, essas práticas podem atuar como pressão de seleção e alterar significativamente a variabilidade das espécies presentes no local.

O estudo da diversidade genética é complexo e envolve extração e análise de sequências de DNA; depende da adaptação genética, de variação inter-individual e especiação e da compreensão da interação entre os organismos que compõem as comunidades, porém pode prover um conhecimento útil para o esclarecimento da biodiversidade, e por

consequência auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação (BERTONI et al., 2010), o que é muito útil para espécies presentes em ambiente perturbados pelo homem e que possuem algum interesse biotecnológico.

Marcadores moleculares são entidades herdáveis capazes de serem detectados por diversas técnicas (OLIVEIRA et al., 2005) e são uma importante ferramenta para ajudar na descoberta e entendimento da variabilidade genética e no estudo da biodiversidade em geral (BERTONI et al., 2010).

Marcadores moleculares tem sido usados em plantas para detecção de variabilidade e similaridade genética (SALLA et al., 2002; VIDAL et al., 2005; ANDRADE et al., 2007; SANTOS et al., 2007; BELLON et al., 2009), estas técnicas com uso de DNA conseguem detectar polimorfismo entre indivíduos geneticamente relacionados e são usados em estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética (LOPES et al., 2003).

A técnica AFLP é usada no estudo de polimorfismo genético em populações, é derivada das técnicas de RFLP e RAPD e possui algumas de suas características como o polimorfismo gerado por enzimas de restrição (RFLP) e a amplificação seletiva pelo uso de primers com alguns nucleotídeos aleatórios na extremidade 3' (RAPD) (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), suas vantagens são a capacidade de detecção de múltiplos locos por reação e repetibilidade.

O AFLP pode gerar muitos marcadores dispersos por todo o genoma, o que o torna uma poderosa ferramenta para o mapeamento de genes de importância agrônômica em plantas (VAN DER VOORT et al., 1999; LEHMENSIEK et al., 2001) e também pode ser aplicada a estudos de taxonomia e diversidade genética em bactérias, fungos, animais e plantas (MÜELLER e WOLFENBARGER, 1999).

Pouco se conhece sobre a biologia desta espécie e nenhuma referência bibliográfica foi encontrada sobre métodos de propagação; diferenças genéticas entre populações de plantas isoladas podem ser um fator ligado à grande variação de toxicidade (de 1,25 a 15 g.kg⁻¹) existente entre plantas coletadas em vários municípios da Amazônia para a realização de experimentos (TOKARNIA et al., 2007), estudos sobre a variabilidade genética

e diferenças genéticas entre populações podem contribuir para esclarecer este fato.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre plantas de *A. bilabiata* coletadas em áreas de várzea de três municípios do Amazonas, com marcadores AFLPs e estimar a distância genética entre os indivíduos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Genética de Microorganismos - LAGEM (ICB), laboratório de Plantas Daninhas, laboratório de Microbiologia e laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas.

2.2.1 Coleta do material vegetal

Foram coletadas folhas de *A. bilabiata* em áreas de pastagens em três municípios do Amazonas: Autazes, Itacoatiara e Parintins, em dois locais de coleta em cada município (Tabela 1 e Figura 1). As folhas coletadas estavam em idade intermediária, com coloração verde e menor rigidez do que as folhas maduras. Os locais de coleta foram georreferenciados com o auxílio de um aparelho GPS Garmim, modelo GPS III Plus.

Local de coleta	Código	Coordenadas geográficas	Nº de indivíduos amostrados /avaliados	Característica da área
Ramal AZ2, Km 5, margem direita, Autazes, AM.	AUT1 a AUT16	S 03° 41' 34,8" WO 59° 07' 24,7"	18/16	Pastagem abandonada, registro de ocorrência de intoxicação no local.
Ramal do Ferro Quente, várzea do Igarapé Grande, Autazes, AM.	AUT17 a AUT22	S 03° 44' 01,9" WO 59° 07' 08,6"	18/6	Área de várzea do Igarapé Grande.
Fazenda, bairro Centenário, Itacoatiara, AM.	ITA1 a ITA14	S 03° 07.811' WO 58° 27.531'	15/14	Área de pastagem próxima à periferia da mata.
Lago do Camaçari,	ITA15 a	S 03° 02' 704'	15/7	Área de pastagem às

Itacoatiara, AM.	ITA21	WO 58° 25' 389"		margens do Lago do Canaçari.
Fazenda Kataca, Parintins, AM.	PAR 1 a PAR10	S 02° 37,833" WO 056° 42,370"	15/10	Área de pastagem infestada de chibata, às margens do Igarapé do Parananema.
Sítio Retiro, Igarapé do Parananema, Parintins, AM.	PAR 11 a PAR22	S 02° 41,644' WO 56° 46,998'	15/12	Restinga ao lado de um curral, próxima ao município de Parintins.
Total de indivíduos amostrados/avaliados			96/65	

Tabela 1. Locais de coleta de *Arrabidaea bilabiata* para estudo de variabilidade genética com marcadores AFLP. Manaus, 2010.



Figura 1. Mapa do Estado do Amazonas, destacando os municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins.

Fonte: <http://n.i.uol.com.br/ultnot/0904/18amazonas.jpg>. Consultado???? em: 18/08/2010

As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos *ziplock*® com sílica azul (1 a 4mm), posteriormente foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha e novamente acondicionadas nos *ziplock*®. Ao chegar ao laboratório foram armazenadas em *freezer* à temperatura de -18 °C até a extração do DNA.

Plantas oriundas dos locais de coleta foram levadas ao herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e identificadas pelo

técnico José Ramos Ferreira. Foram confeccionadas exsicatas e depositadas no herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM), sob o número 7984 (Anexos).

2.2.2 Extração de Ácidos Nucleicos

O protocolo usado para a extração do DNA foi o protocolo CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990) modificado por Hoisington et al. (1994).

Foram usados 0,06 g de cada amostra triturados em nitrogênio líquido e o macerado obtido foi transferido para microtubos de 2 mL, em seguida ressuspendeu-se em 700 μL de tampão de CTAB (hexadecil-trimetilamônio de bromida) (2,0 g de CTAB (2% p/v); 8,12 g de NaCl 1,4 M; 4 mL de EDTA 20 mM; 10 mL de Tris-HCl pH 8,0; 1% p/v de polivinil pyrrolidone e água destilada e deionizada) ao qual se adicionou β -mercapto-etanol no momento do uso (2 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de β -mercapto-etanol) homogeneizando as amostras com o tampão. As amostras foram mantidas a 65° C durante 30 minutos, agitando-se os microtubos a cada dez minutos. Após resfriamento foram acrescentados 600 μL de clorofórmio/álcool isoamílico (CIA) na proporção de 24:1 (v:v) a cada microtubo e depois as amostras foram agitadas por inversão por cinco minutos. As amostras foram submetidas à centrifugação à 15000 rpm por dez minutos. Transferiu-se a fase superior para novo microtubo. O DNA foi precipitado da fase sobrenadante com 400 μL de álcool isopropanol absoluto (-20 °C) por no mínimo 2 hs. As amostras foram centrifugadas a 7500 rpm durante dez minutos. O *pellet* de DNA foi lavado com etanol 70% (duas vezes) e etanol absoluto. Após secagem à temperatura ambiente o DNA foi ressuspendido em 30 mL de tampão TE (1 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0; 0,2 mL de 0,5 M EDTA pH 8,0, água destilada e deionizada) mais RNase (0,025 $\mu\text{L}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) seguido de incubação por duas horas.

As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 0,8% (Gibco BRL), coradas com brometo de etídio (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e visualizadas sob luz ultra violeta em transiluminador e fotodocumentadas. A estimativa da concentração e a padronização em 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de DNA foi feita pela

comparação visual da intensidade das bandas com um padrão de peso molecular (*High DNA Mass Ladder* - Invitrogen 100 a 10000 pb).

2.2.3 Análise de polimorfismos com marcadores AFLP

A obtenção dos marcadores AFLPs foi realizada seguindo-se o protocolo de Vos et al. (1995) e todas as etapas das reações foram realizadas em termociclador Biocycler modelo MJ96G.

A digestão do DNA genômico foi realizada pela combinação das enzimas de restrição *EcoRI*/*MseI*, utilizando 200 ng de DNA genômico, 5 μL do tampão *One Phor All* 10X (OPA; Amersham), 0,5 μL 100X albumina de soro bovino (BSA) (10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0,5 μL da enzima *MseI* (10 unidades. μL^{-1} , New England Biolabs) e 0,4 μL da enzima *EcoRI* (12 unidades. μL^{-1} , Gibco) em volume final completado para 50 μL com água ultrapura autoclavada. A digestão foi realizada a 37 °C durante três horas. Após a digestão, as enzimas foram inativadas a 70 °C durante 15 minutos.

Os adaptadores foram preparados em quantidade suficiente para a ligação de 120 amostras. Para o preparo do adaptador *EcoRI* foram utilizados 5,9 μL (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de adaptador “*EcoRI* F” (5´CTCGTAGACTGCGTACC3´), 4 μL (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de adaptador “*EcoRI* R” (5´ATTTGGTACGCAGTCTAC 3´), 6 μL do tampão OPA 10X (“One Phor All”, Amersham) e 104,1 μL de água ultrapura autoclavada. No preparo do adaptador *MseI* foram utilizados 33,5 μL (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de adaptador “*MseI* F” (5´GACGATGAGTCCTGAG 3´), 29,9 μL (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de adaptador “*MseI* R” (5´TACTCAGGACTCAT 3´), 7 μL do tampão OPA 10x (“One Phor All”, Amersham) e 49,6 μL de água ultrapura autoclavada. O preparo dos adaptadores com o seguinte perfil foi realizado a 65 °C por dez minutos, 37 °C por dez minutos e posteriormente 25 °C por dez minutos e depois armazenados a -20 °C.

Aos fragmentos gerados pela digestão foram ligados adaptadores em uma reação contendo 1 μL do tampão das enzimas *T4* DNA Ligase 10X (Invitrogen), 1 μL dos adaptadores da enzima *EcoRI*, 1 μL dos adaptadores da enzima *MseI*, 0,33 μL de *T4* DNA ligase (3 unidade. μL^{-1} , Invitrogen), 6,7 μL de água ultrapura autoclavada e 50 μL da reação de digestão descrita acima. As

reações de ligação foram realizadas a 23 °C durante três horas e posteriormente armazenados a -20 °C.

Os fragmentos de DNA foram amplificados em duas reações. Na primeira, denominada de pré-amplificação, foram utilizados *primers* com um nucleotídeo adicional (nucleotídeo seletivo) em seu terminal 3', ao passo que na segunda, denominada de amplificação seletiva, foram utilizados *primers* com três nucleotídeos adicionais em seu terminal 3', sendo o primeiro nucleotídeo correspondente ao utilizado na pré-amplificação.

Os *primers* utilizados nas reações de pré-amplificação foram E+A e M+C. As reações de pré-amplificação foram compostas por 2,5 µL da amostra de DNA digerido e ligado aos adaptadores conforme descrito acima, 0,5 µL do *primer* da enzima de corte raro (E+A) (50 ng.µL⁻¹), 0,5 µL do *primer* da enzima de corte freqüente (M+C) (50 ng.µL⁻¹), 0,4 µL de dNTP 10 mM (Gibco), 1 µL do tampão *Mg Free Buffer* 10X, 1,2 µL MgCl₂ 25 mM, 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades.µL⁻¹) e 3,6 µL de água ultrapura autoclavada, para completar um volume de 10 µL.

O programa de pré-amplificação foi composto de 26 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94 °C por dois min. Cada ciclo foi constituído de um min a 94 °C (desnaturaçãõ), um min a 56 °C (hibridizaçãõ) e um min a 72 °C (extensãõ). O ciclo final foi seguido de cinco min a 72 °C. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos acrescentando-se 40 µL de água ultrapura autoclavada e armazenados a -20 °C.

As combinações de *primers* seletivos utilizadas foram as seguintes: E+ATC/M+CGC, E+AGC/M+CAT, E+AAC/M+CAC e E+AGT/M+CCA. Nas reações de amplificação foram utilizados 3 µL do produto da pré-amplificação diluído, 1 µL do *primer* das enzimas de corte raro (E+ANN) (50 ng.µL⁻¹), 1,2 µL do *primer* M+CNN (50 ng.µL⁻¹), 0,4 µL de dNTP 10 mM (Gibco), 2 µL do tampão da *Taq* polimerase 10X, 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades.µL⁻¹) e 11 µL de água ultrapura autoclavada.

O programa de amplificação seletiva utilizado consistiu de desnaturação inicial a 94 °C durante dois minutos, doze ciclos compostos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C e um min a 72 °C seguidos de 23 ciclos compostos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C e um minuto a

72 °C. O ciclo final de extensão foi seguido de dois min a 72 °C, quando ao final as amostras foram armazenadas a -20 °C, para posterior utilização.

Após a amplificação seletiva foi adicionado 8 µL da solução tampão de carregamento (10 mL formamida deionizada 98%, 200 µL EDTA 0,5 M pH 8,0, 10 mg de xileno-cianol (0,025%) e 10 mg de azul de bromofenol (0,025%)) e procedida a desnaturação das amostras a 94 °C.

Após a amplificação seletiva e desnaturação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida/bis(acrilamida) (19:1) 6%, uréia 7,5 M, tampão 1X TEB] de 0,5 mm de espessura. Foi utilizado o sistema eletroforético "Sequi-Gen GT" (Biorad) de 38 x 50 cm e pente para 65 amostras. O gel foi submetido a uma eletroforese inicial (pré-corrida) sob potência constante de 80 W por 50 minutos. Na parte superior da cuba foi utilizado TEB 1X e, na parte inferior, TEB 1X/acetato de sódio 3 M. Os produtos das amplificações foram carreados por aproximadamente três horas e meia.

Para revelação dos géis foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata seguindo o protocolo proposto por Creste et. al. (2001), que constou de uma imersão em solução de fixação: 10% Etanol; 1% ácido acético por dez minutos, seguida de 1 lavagem em água por um minuto; seguida de imersão em solução de pré-tratamento: 1,5% ácido nítrico por dois minutos e 40 segundos, seguida de uma lavagem em água por um minuto; imersão em solução de impregnação: 2g/litro de AgNO₃ (nitrato de prata) por 20 minutos, seguido de 2 lavagens em água de 30 segundos cada; imersão em solução reveladora: 30g/litro de Na₂CO₃ (carbonato de sódio), 300 µl de formaldeído/litro, 1,5 L na primeira bandeja até o aparecimento das bandas e 1,5 L na segunda bandeja até a definição das bandas; imersão em solução de bloqueio: ácido acético 5% e lavagem em água destilada e deionizada por um minuto. Todos os processos de imersão foram realizados em bandejas plásticas sob agitação.

Após a secagem das placas as imagens foram capturadas utilizando um "scanner" HP Deskjet F 380 All-in-One.

2.2.4 Análise dos resultados

Para a análise dos dados foram consideradas a presença e ausência de fragmentos de AFLP, os quais foram transferidos para uma matriz onde a ausência de uma dada banda foi denominada por 0 e a presença da banda por 1.

As similaridades genéticas entre os indivíduos das populações de *A. bilabiata* de cada local de coleta, tomadas duas a duas foram calculadas pelo coeficiente de Jaccard (1976):

$$J(x,y) = a/(n-d)$$

onde \underline{x} e \underline{y} representam os indivíduos, \underline{a} representa o número de fragmentos em comum entre os dois indivíduos, \underline{n} o número total de fragmentos avaliados e \underline{d} o número de fragmentos ausentes nos dois indivíduos.

Estes valores foram utilizados para a obtenção de uma segunda matriz que, por sua vez, foi submetida à análise de *cluster* pelo método não ponderado de agrupamento de pares utilizando a média aritmética (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) de Sokal e Michener (1958), cujo resultado pode ser visualizado na forma gráfica de um dendrograma.

Todos os cálculos de similaridades e construção do dendrograma foram efetuados com auxílio do programa de computador NTSYS (State University of New York; EUA) (ROHLF, 2000) e do o *software* FRETREE (PAVLICEK *et al.*, 1999).

A consistência das ramificações do dendrograma foi verificada por meio da técnica de amostragem repetitiva (1000 repetições) de dados (*bootstrapping*) pelo *software* FRETREE (PAVLICEK *et al.*, 1999).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bandas amplificadas pelas quatro combinações de primers variaram de 59 (E+ATC / M+CGC) a 85 (E+AGT/ M+CCA) com uma média de 76 bandas polimórficas entre 300 e 800 pares de bases (Figura 2). Foram amplificadas um total de 309 bandas com uma porcentagem de 98,5% de polimorfismo, as quais foram usadas como marcadores para análise de variabilidade genética nessa espécie (Tabela 2).

Dentro de uma espécie os cromossomos homólogos têm grande similaridade entre si, mas em determinados locais do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA (ROCHA et al., 2007). Quando a frequência do seu alelo mais comum é menor ou igual a 0,99 (MORTON e KRIEGER, 1966) ou 0,95 (AYALA, 1982) esse *loci* pode ser considerado polimórfico.

Um total de bandas polimórficas próximas a este número foram encontradas por Zhu et al. (2009) que estudaram a espécie *Incarvillea younghusbandii* Sprague uma bignoniaceae herbácea endêmica dos platôs tibetanos, e encontraram com marcadores AFLP um total de 332 bandas; Buttow et al. (2010) também com quatro combinações de *primers* obtiveram em *Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae) 93,5% de polimorfismo, resultados próximos dos obtidos neste trabalho.

Salla et al. (2002) usando marcadores RAPD em acerola (*M. emarginata*) obteve 90,8% de polimorfismo e associou este alto polimorfismo encontrado à variabilidade observada com base em caracteres morfológicos e agrônômicos na espécie.

Neste trabalho foi observada grande variação fenotípica em *A. bilabiata* nos municípios de coleta e a literatura faz referência à grande variação de toxicidade em experimentos realizados (TOKARNIA et al., 2007), uma das explicações deste fato pode ser o polimorfismo encontrado na espécie, aliado a outros fatores como a interação genótipo-ambiente.

Bertoni et al. (2010) usando marcadores moleculares AFLP em *Jacaranda decurrens* Cham. uma bignoniaceae arbórea, obtiveram um total de 205 bandas e 46,34% de polimorfismo usando uma combinação de quatro pares

de *primers*, dados inferiores aos obtidos neste trabalho; enquanto Zhu et al. (2009) em *I. younghusbandii* Sprague encontraram com marcadores AFLP 55,7% de polimorfismo usando sete pares de *primers*.

As combinações de *primers* que apresentaram maior polimorfismo foram E+ATC/M+CGC e E+AGT/M+CCA (100%). O *primer* com o menor polimorfismo foi E+AAC/M+CAC (95%) (Tabela 2).

Combinação de Primers <i>Eco</i> RI/ <i>Mse</i> I	Total de locos	Locos polimórficos	
		no.	%
E+ATC/M+CGC	59	59	100
E+AGC/M+CAT	81	80	99
E+AAC/M+CAC	84	80	95
E+AGT/M+CCA	85	85	100
Média	77	76	98,5

Polimorfismo = 0,985% (número de locos polimórficos / número total de locos).
A frequência do alelo mais frequente não ultrapassa 0,985%.

Tabela 2. Número de *primers* polimórficos em análise molecular de *Arrabidaea bilabiata* oriundas de três municípios do Amazonas. Manaus, 2010.

O polimorfismo revelado pelos marcadores AFLP é resultado de mutações de ponto, inversões, deleções e inserções que levam à perda ou ganho de um sítio de restrição reconhecido pelas enzimas de restrição de corte raro e frequente usadas nesta técnica, ou pela alteração da sequência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários nos terminais 3' usados na reação de PCR (MARQUES, 2003).

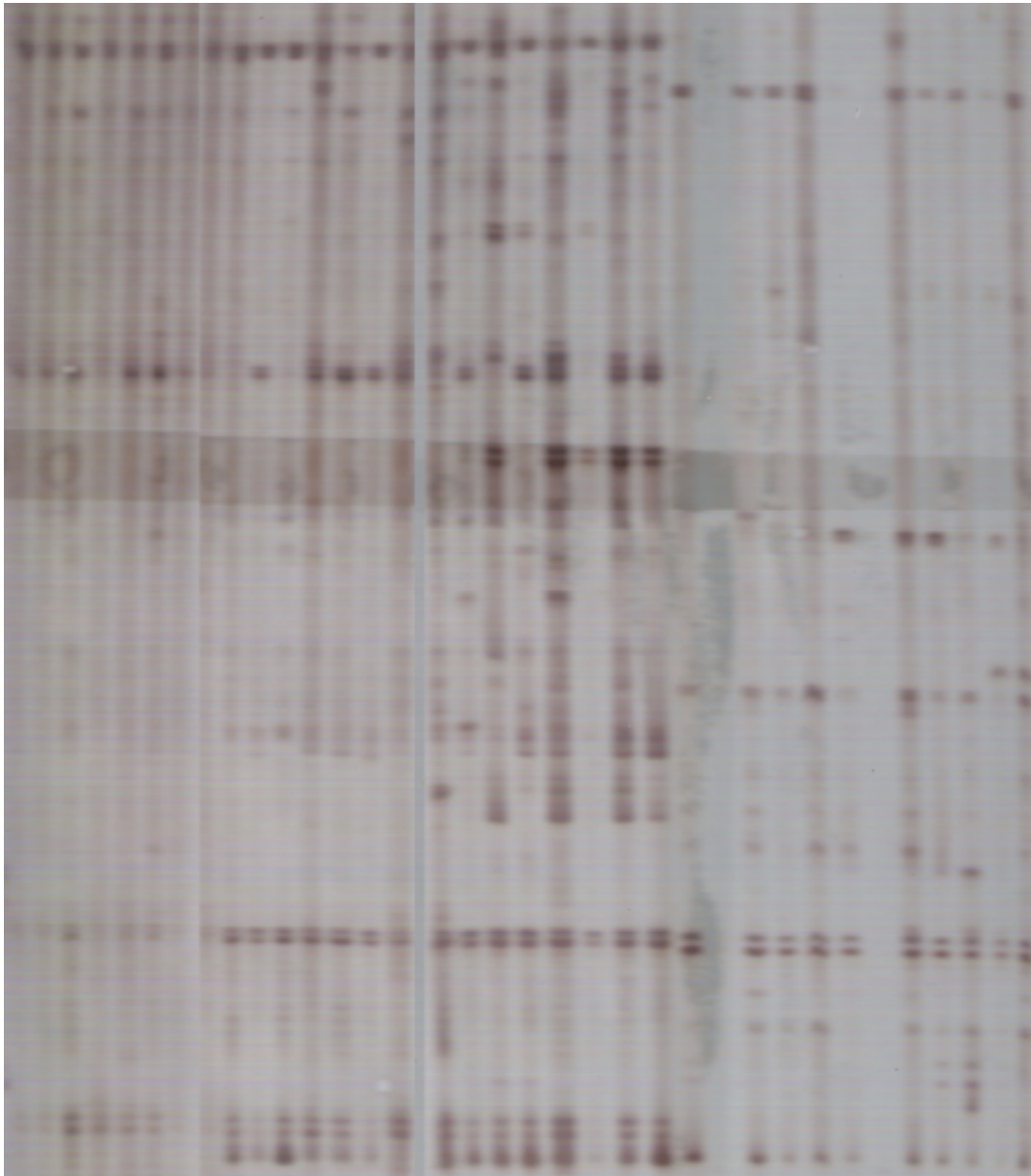


Figura 2. Padrão de DNA genômico de *Arrabidaea bilabiata* amplificado pela técnica de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (AFLP), utilizando duas combinações de *primers* (E+AGC/M+CAT).

Com os dados de ausência e presença de bandas foi construída uma matriz de similaridade (Anexos), com a qual se estimou a distância genética entre os indivíduos analisados.

Nos 65 indivíduos analisados, encontrou-se um coeficiente médio de similaridade de 51,39%, com amplitude de 14,28 a 88,50% conforme a matriz de similaridade (Tabela 3).

Embora tenham sido encontrados alguns indivíduos com altas similaridades, o coeficiente de similaridade médio foi de 51,39% (Tabela 3), valor próximo ao de outras plantas daninhas, que segundo Vidal et al. (2005) costumam apresentar baixa similaridade, pois se desenvolvem e evoluem em ambientes múltiplos. Estes autores usaram marcadores RAPD e obtiveram coeficiente de similaridade médio de 38% em picão preto (*Bidens pilosa* L.); Vasconcelos et al. (2000) obtiveram 39% de similaridade e Winkler et al. (2003) obtiveram 40% de similaridade em *Euphorbia heterophylla* L. (leiteira); porém na espécie *Eichornia crassipes* Solms (aguapé) Cardoso et al. (2002) encontraram alta similaridade, da ordem de 90% (coeficiente médio) o que pode ser explicado pela propagação vegetativa apresentada por esta espécie, o que diminui a possibilidade de recombinação gênica.

As maiores similaridades encontradas neste trabalho estão entre indivíduos do município de Parintins: PAR11 e PAR12 (88,50%), PAR15 e PAR16 (85,32%) e PAR12 e PAR13 (84,83%); de Itacoatiara: ITA20 e ITA21 (78,52%), ITA1 e ITA2 (81,42%); e no município de Autazes: AUT5 e AUT6 (79,71%).

Segundo Buttow et al. (2010) espécies com altos coeficientes de similaridade entre indivíduos de locais geográficos diferentes possuem estratégias eficientes para a dispersão de pólen e sementes. Não há referências na literatura sobre os mecanismos de reprodução de *A. bilabiata*, porém foi verificada a presença de rizomas subterrâneos com função de propagação vegetativa nos locais de coleta e houve sucesso na reprodução vegetativa por estaquia. Este fato aliado à maior similaridade existente em indivíduos da mesma área de coleta indica a possibilidade de baixo fluxo gênico nesta espécie (Figura 3).

Bertoni et al. (2010) usaram marcadores AFLP no estudo da variabilidade genética em *Jacaranda decurrens* e encontraram menor similaridade dentro das populações e não entre elas, ao contrário deste trabalho, porém estudos anteriores sobre as estratégias de dispersão de *J. decurrens* indicaram que a espécie possui sementes aladas e dispersão anemófila, o que leva as sementes a percorrerem grandes distâncias.

A. bilabiata é uma espécie que possui frutos em forma de cápsula alongada com cerca de 20-30 cm de comprimento e valvas caducas quando

maduras; as sementes são achatadas, coriáceas e não aladas (MOBOT,2006), e embora não haja estudos sobre a dispersão da espécie, sua morfologia não sugere que haja dispersão anemófila, que ocorre em sementes pequenas, leves e aladas e costuma ocasionar maior variação dentro da população (LOVELESS e HAMRICK, 1984). A floração, produção e liberação de sementes em *A. bilabiata* ocorre no momento da cheia dos rios (observação feita *in loco*, dados não publicados). Tais sementes provavelmente são dispersas ao longo das calhas dos rios e afluentes da várzea.

Os menores coeficientes de similaridade encontrados estão entre os indivíduos dos municípios de Autazes e Itacoatiara e Autazes e Parintins (AUT1 E ITA20 - 14,28%; AUT2 e ITA20 - 15,42%; AUT2 e PAR1 - 15,72% e AUT1 e PAR1 - 15,82%) (Tabela 3), a distância geográfica entre estes municípios pode ser vista na figura 4.

Indivíduos analisados	Maior similaridade	Indivíduos analisados	Menor similaridade
PAR11 e PAR12	88,50%	AUT1 e ITA20	14,28%
PAR15 e PAR 16	85,32%	AUT2 e ITA20	15,42%
PAR12 e PAR13	84,83%	AUT2 e PAR1	15,72%
PAR14 e PAR15	84,78%	AUT1 e PAR1	15,82%
PAR14 e PAR16	83,51%	AUT20 e ITA12	16,16%
PAR13 e PAR14	83,06%	AUT1 e ITA13	16,46%
ITA1 e 1TA2	81,42%	AUT20 e PAR5	16,56%
PAR15 e PAR17	80,57%	AUT1 e ITA21	16,57%
AUT5 e AUT6	79,71%	AUT2 e ITA20	17,07%
ITA20 e ITA21	78,52%	AUT20 e PAR9	17,08%

Procedência: AUT1 a AUT22 - Autazes, ITA1 a ITA21 - Itacoatiara e PAR1 a PAR22 - Parintins.
 Coeficiente de similaridade = (índice de similaridade de Jaccard x100)

Tabela 3. Maiores e menores coeficientes de similaridades e entre os indivíduos de *Arrabidaea bilabiata*. Manaus, 2010.

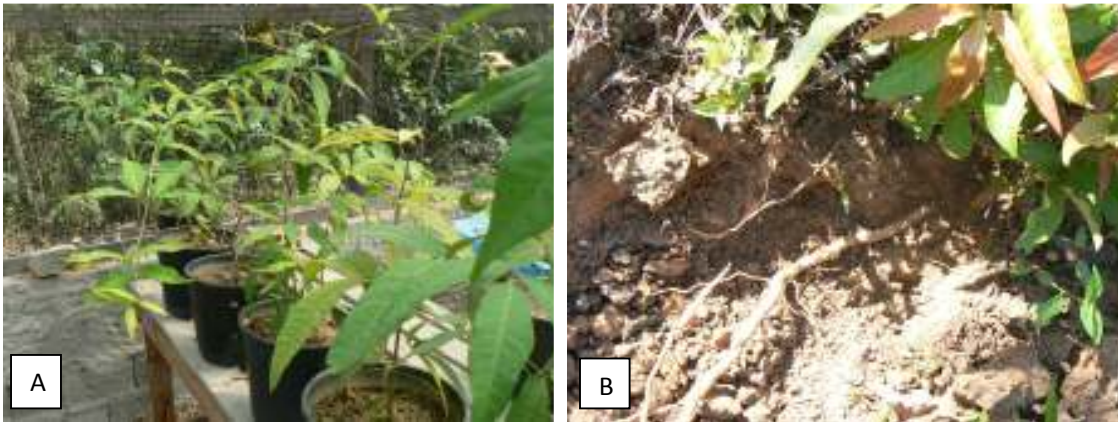


Figura 3 - A. Plantas de *Arrabidaea bilabiata* oriundas de estaquia, UFAM. B - Rizoma (caule modificado) de *Arrabidaea bilabiata*, Autazes, AM, setembro de 2008. Fotos: Souza, L.



Figura 4 - Distância entre os municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins, no Estado do Amazonas. Imagem: Google Earth.

No ramal AZ2 (Autazes) os indivíduos apresentavam certa variação fenotípica, com heterofilia em folhas (variação de forma) e folhas com dois ou três folíolos (Figura 5), o que é comum na espécie (SAMPAIO, 1935; GOMES JUNIOR, 1951), a amplitude dos coeficientes de similaridade neste local que variaram de 29,24 a 79,71% (Tabela 4) e está de acordo com os resultados de Muhlen, Martins e Ando (2000) que com marcadores microssatélites em

mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) encontraram grande amplitudes de similaridade (24 a 100%) com média de 59%, valores próximos aos encontrados neste trabalho.



Figura 5. A. Ramos com dois e três folíolos em *Arrabidaea bilabiata*. B. heterofilia de folhas em *Arrabidaea bilabiata* - município de Autazes, AM, 2007. Foto: Souza, L.

No ramal do Ferro Quente (Autazes) houve menor amplitude nos coeficientes de similaridade, entre 43,97 e 68,87% (Tabela 4) mostrando menor variação entre os indivíduos coletados, porém esta indicação não pode ser levada em conta como uma tendência, pela pequena quantidade de indivíduos analisados (seis indivíduos).

Em nenhum outro local de coleta as plantas apresentaram grande variação fenotípica entre si. As plantas do Igarapé do Parananema (Parintins) foram as que apresentaram os seis maiores coeficientes de similaridade dentre todos os indivíduos analisados (Tabela 4), a amplitude do coeficiente de similaridade deste local ficou entre 47,76 e 88,50%. Este local era uma pequena propriedade agrícola às margens de um Igarapé, o proprietário havia retirado os bovinos da área pelo grande índice de intoxicação por chibata e no momento da coleta criava porcos no local.

Indivíduos com alta similaridade genética costumam formar “ilhas” onde há maior possibilidade de ocorrer fluxo gênico via pólen ou semente, Vidal et al. (2005) em um estudo com marcadores RAPD observaram este comportamento em *B. pilosa*.

Local de coleta/Município	Amplitude dos coeficientes de similaridade
Ramal AZ2 - Autazes	29,24% a 79,71%
Ramal do Ferro Quente - Autazes	43,97% a 68,87%
Fazenda Kataca - Parintins	48,07% a 74,56%
Igarapé do Parananema - Parintins	47,76% a 88,50%
Bairro Centenário - Itacoatiara	46,85% a 81,42%
Lago do Camaçari - Itacoatiara	40,69% a 65,74%
Amplitude Geral	14,28% a 88,50%

Coeficiente de similaridade = (índice de similaridade de Jaccard x100)

Tabela 4. Amplitude dos coeficientes de similaridade encontrados em *Arrabidaea bilabiata* nos locais de coleta dos municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins, Amazonas. Manaus, 2010.

A distância genética média (100 - coeficiente de similaridade) foi de 48,61% entre os indivíduos de *A. bilabiata* (Tabela 5). Rutledge et al. (2000) encontraram 43% de distância genética entre 16 populações de *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. com marcadores RAPD, valor semelhante ao obtido neste trabalho.

Os indivíduos mais distantes, geneticamente, foram os de Autazes e Itacoatiara e Autazes e Parintins (Tabela 5), corroborando a diferença fenotípica observada em campo. As menores distâncias genéticas ocorreram entre os indivíduos do igarapé do Parananema (Parintins), onde provavelmente ocorreu maior fluxo gênico (Tabela 5).

Indivíduos analisados	Menor distância genética	Indivíduos analisados	Maior distância genética
PAR11 e PAR12	11,50%	AUT1 e ITA20	85,7%
PAR15 e PAR16	14,68%	AUT2 e ITA20	84,58%
PAR12 e PAR13	15,17%	AUT2 e PAR1	84,28%
PAR14 e PAR15	15,22%	AUT1 e PAR1	84,18%
PAR14 e PAR16	16,49%	AUT20 e ITA12	83,84%
PAR13 e PAR14	16,94%	AUT1 e ITA13	83,54%
ITA1 e ITA2	18,58%	AUT20 e PAR5	83,44%
PAR15 e PAR17	19,43%	AUT1 e ITA21	83,43%
AUT5 e AUT6	20,29%	AUT2 e ITA13	82,93%
ITA20 e ITA21	21,48%	AUT20 e PAR9	82,92%

Distância genética = (100 - Coeficiente de Similaridade).

Procedência: AUT1 a AUT22 - Autazes, ITA1 a ITA21 - Itacoatiara e PAR1 a PAR22 - Parintins.

Coeficiente de similaridade = (índice de similaridade de Jaccard x100)

Tabela 5. Maiores e menores índices de distanciamento genético entre os indivíduos de *Arrabidaea bilabiata*. Manaus, 2010.

Esta menor distância genética dentro dos locais de coleta é explicada em parte pela reprodução vegetativa que ocorre nesta espécie, observada em campo e em casa de vegetação; e a maior distância genética entre os indivíduos dos municípios de Autazes em relação aos indivíduos dos municípios de Itacoatiara e Parintins pode ter motivos geográficos.

Os municípios de Itacoatiara e Parintins estão localizados na calha do rio Amazonas, enquanto o município de Autazes está situado mais próximo ao rio Madeira (Figura 6), o segundo local de coleta neste município ficava próximo a um afluente do Rio Madeira.

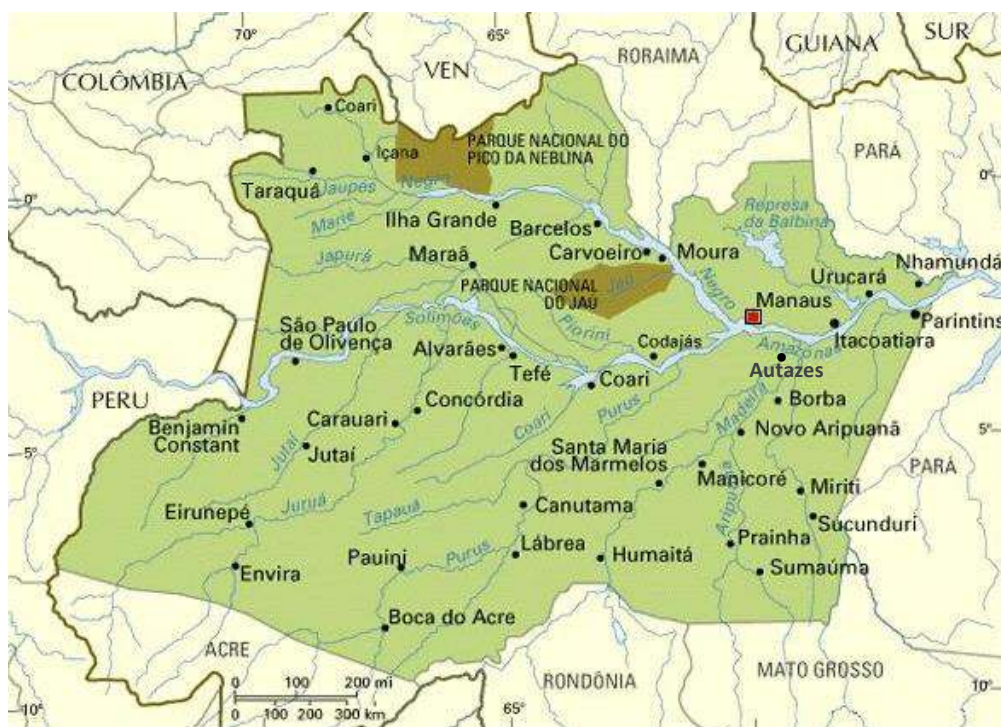


Figura 6. Localizações dos municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins em relação ao rio Amazonas. Imagem: <http://www.viagemdeferias.com/mapa/amazonas.gif>. Consultada em: 22/08/2010.

Por se tratar de uma espécie de várzea que, raramente produz sementes, e isto ocorre na época da cheia (dados observados nos locais de coleta), existindo uma probabilidade de que estas sementes, ou partes vegetativas (fragmentos de ramos ou rizomas) sejam carregadas pelo rio e levadas para os municípios na calha do rio Amazonas.

O dendrograma (figura 7) exibe a formação de dois grupos. O primeiro grupo inclui os indivíduos do município de Autazes e o segundo grupo foi formado por indivíduos dos municípios de Itacoatiara e Parintins (Figura 7).

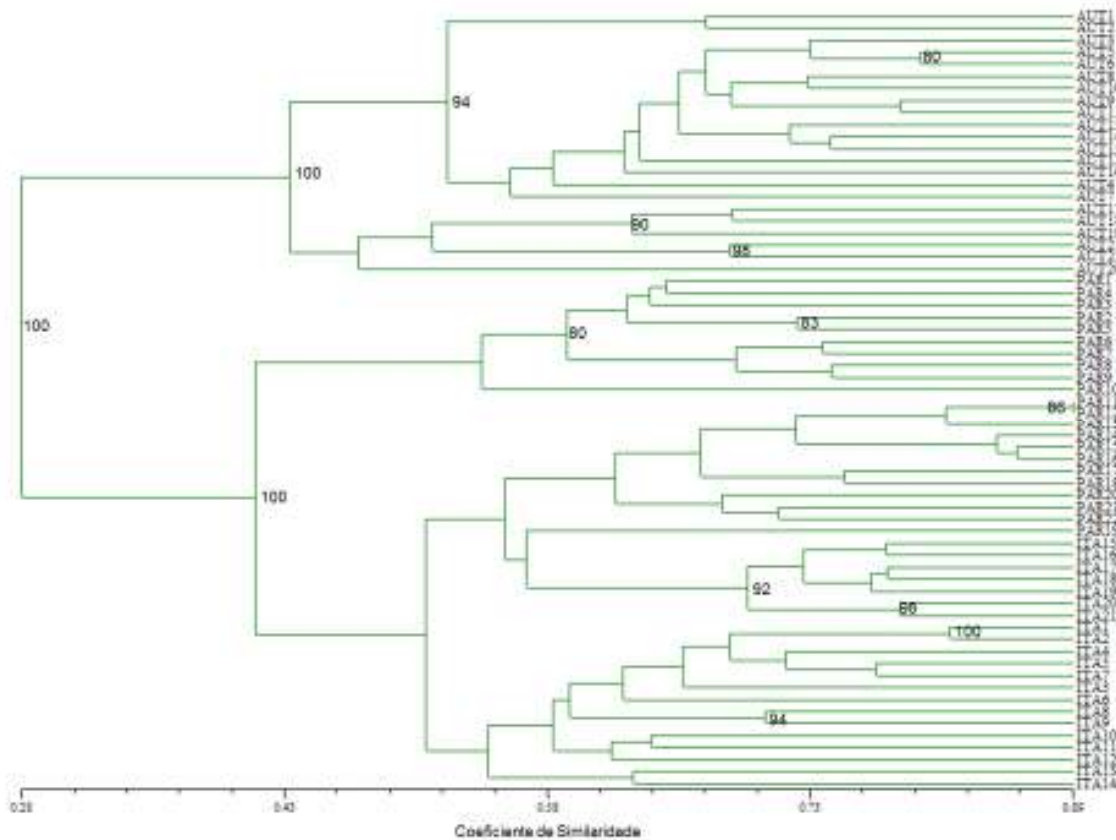


Figura 7. Agrupamento dos 65 indivíduos de *Arrabidaea bilabiata* dos municípios de Autazes, Itacoatiara e Parintins, AM, através da similaridade genética calculada pelo coeficiente de Jaccard com a análise de agrupamento UPGMA com os primers *EcoRI/ MseI* E+ATC/M+CGC, E+AGC/M+CAT, E+AAC/M+CAC e E+AGT/M+CCA com *bootstrap* de 1000 repetições.

A formação destes grupos isolados com os indivíduos de Autazes em um grupo e os indivíduos de Itacoatiara e Parintins em outro grupo permite supor que estes indivíduos estão isolados não apresentando fluxo gênico entre si. Porém, os indivíduos de Itacoatiara e Parintins não apresentaram o mesmo comportamento.

Vários fatores podem ser responsáveis pelo nível de variação genética existente em espécies vegetais, essa variação pode ser fortemente afetada

pela distribuição geográfica, forma de vida, tamanho da população e sistema reprodutivo (ZHU et al., 2009).

A distribuição geográfica exerce grande influência quanto à variação entre plantas além do fluxo gênico e do sistema reprodutivo (BUTTOW et al., 2010); várzeas e baixios inundáveis são áreas interconectadas por cursos de água que podem auxiliar no processo de dispersão de sementes de determinadas espécies, que costumam florescer e frutificar na época da cheia (KUBITZKI e ZIBURSKI, 1994).

A dispersão com o auxílio de cursos de água é chamada de dispersão hidrocórica e ocorre em espécies localizadas às margens de rios e lagos ou em locais inundáveis, estas sementes não germinam enquanto estão submersas, mas flutuam e permanecem viáveis (LOBO et al., 1995), espécies com este mecanismo concentram sua produção de flores e sementes nas épocas de inundação, este mecanismo de dispersão é considerado de maior alcance, pois permite que as sementes flutuem sendo levadas para locais mais distantes (OLIVEIRA e PIEDADE, 2002).

Não é possível afirmar, porém, que ocorre dispersão hidrocórica das sementes de *A. bilabiata*, pois seria necessário observar a fenologia da espécie e realizar um teste de flutuabilidade de sementes, o que não estava no escopo deste trabalho.

Quanto ao sistema reprodutivo, não existe na literatura referência ao sistema reprodutivo de *A. bilabiata*, porém a espécie possui certo grau de reprodução vegetativa, a morfologia das sementes desta espécie sugere que as mesmas dificilmente teriam habilidade para se dispersar por via anemófila, uma vez que não são aladas. Zhu et al. (2009) com marcadores AFLP observaram em *I. younghusbandii* a formação de sete grupos bem definidos, de acordo com a sua origem geográfica sugerindo fluxo gênico limitado entre as populações; tais autores tampouco tinham conhecimento sobre a dispersão de sementes desta espécie porém inferiram que a mesma não sofria dispersão anemófila com base em sua morfologia.

Os resultados encontrados neste trabalho podem sugerir que as plantas de *A. bilabiata* possam ter tido uma origem comum há muito tempo atrás, e que com o passar do tempo foram sofrendo seleção, deriva,

isolamento geográfico e mutações que as estruturaram em subpopulações. Estudos genéticos em regiões mais amplas, com populações com maior número de indivíduos e com auxílio do estudo da fenologia da espécie e da biologia reprodutiva podem auxiliar na compreensão dos fatores que influenciaram a variação genética existente nos indivíduos analisados.

2.4 CONCLUSÕES

Os marcadores AFLP foram eficientes para caracterizar a variabilidade genética nos 65 indivíduos de *A. bilabiata* analisados.

A maior variabilidade em *A. bilabiata* para os locais de coleta estudados está entre os locais de coleta.

Houve formação de dois grupos isolados, o primeiro agrupou os indivíduos do município de Autazes e o segundo os indivíduos de Itacoatiara e Parintins.

A existência de maior variabilidade interpopulacional e não intrapopulacional sugere a existência de baixa taxa de propagação reprodutiva e talvez baixa eficiência na dispersão de sementes e pólen, o que precisa ser verificado por estudos que determinem a biologia reprodutiva e o sistema de dispersão desta espécie.

CAPÍTULO 3 - Teste de extratos de *Arrabidaea bilabiata* no controle de fungos fitopatogênicos

RESUMO

Plantas daninhas são fontes potenciais de metabólitos secundários e outros compostos com potencial biotecnológico. Algumas plantas daninhas do gênero *Arrabidaea* são estudadas por suas atividades medicinais, tóxicas e antifúngicas. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do extrato aquoso de *A. bilabiata* autoclavado e filtrado (EA e EF) e do extrato etanólico (EE) sobre os fungos *Alternaria brassicae*, *Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassicola* e *Sclerotium rolfsii* e em meio de cultura BDA. Não houve diferença significativa entre o controle e as placas com EA a 2% ($P > 0,05$) para as médias dos diâmetros dos fungos das espécies *S. rolfsii* e *A. brassicae*. Para a espécie *C. cassicola* houve um maior crescimento micelial nas placas com meio de cultura com o EA, em relação ao controle e para *C. guaranicola* houve diferença significativa, com menor crescimento fúngico no meio com o EA; o que mostra um possível potencial deste extrato como método de controle alternativo para esse fungo que tem de ser avaliado *in vivo*. O EF testado não demonstrou propriedades fungitóxicas no crescimento micelial de *C. cassicola* mesmo nas concentrações mais elevadas. Para *S. rolfsii* houve redução do tamanho da colônia da ordem de 50% na concentração de 40% de EF de *A. bilabiata* em relação à testemunha. O EF promoveu redução da esporulação de *C. cassicola* nas concentrações 20 e 40% em 62% e 70% respectivamente, em relação ao controle. A redução de esporulação de *C. cassicola* mostra o potencial do extrato como alternativa de controle biológico, por inibir a formação de esporos do fungo, reduzindo desta forma a quantidade de inóculo do patógeno no campo. Com relação ao fungo *S. rolfsii*, a atividade estimulante na produção de escleródios observada *in vitro*, não indica o uso do extrato de *A. bilabiata* em campo, pois os escleródios são estruturas de resistência e sobrevivência do patógeno, extremamente eficientes, dificultando o controle da doença. Para os fungos *S. rolfsii* e *C. cassicola* não houve inibição do crescimento micelial nas concentrações utilizadas no experimento com EE de *A. bilabiata*, o crescimento das colônias tomou toda a placa de Petri sem formação de halo de inibição, mesmo após a repetição dos experimentos com as concentrações padrão e as concentrações triplicadas. Esse resultado demonstrou que o etanol não foi eficiente para extrair a(s) substância(s) antifúngica(s) de *A. bilabiata*.

Palavras-chave: controle biológico, plantas tóxicas, chibata, plantas daninhas, várzea

3.1 INTRODUÇÃO

Algumas plantas daninhas são conhecidas como potenciais produtoras de aleloquímicos e produtos para uso biotecnológico, princípios ativos para produção de medicamentos, fungicidas, inseticidas e outros compostos com bioatividade. Seja na indústria farmacêutica ou na indústria agroquímica.

Extratos vegetais são preparados obtidos mediante diversos procedimentos aos quais se submete o tecido vegetal selecionado para este fim, na natureza existem cerca de 250.000 a 500.000 espécies vegetais, das quais se estima que menos de 10% tenham tido suas propriedades químicas e biológicas estudadas (ANGARITA, 2010), cerca de 3.000 compostos naturais de origem vegetal já mostraram atividades como bactericida, inseticida, fungicida, repelente e nematocida (SINGH e SINGH, 2000; KAGALE et al., 2004; OBLEDO-VÁSQUEZ, FLORES-VERDUZCO e CERVANTES-MARTÍNEZ, 2004).

Os extratos vegetais podem agir no controle de fitopatógenos por ação direta como inibidor na germinação de esporos ou redução do crescimento micelial, mas também na indução de resistência em plantas limitando o avanço ou o desenvolvimento do patógeno (KAGALE et al., 2004; ANGARITA, 2010).

Testes fitoquímicos realizados em *Senna alata* demonstraram a presença de compostos como cumarinas, flavonoides e ácidos graxos, classes químicas já consagradas por sua atividade alelopática (RODRIGUES et al., 2009). A toxicidade de *Sonchus oleraceus* foi testada sobre o microcrustáceo *Artemia salina* e demonstrou potencial biotecnológico para o tratamento de doenças provocadas por radicais livres (LIMA et al., 2009); extratos das folhas de *Acapu* (*Vouacapoua americana*) demonstraram efeitos redutores máximos da ordem de 75,55 e 54,34% na germinação das sementes de malícia e malva (SOUZA FILHO e ALVES, 2000).

O uso de extratos vegetais como alternativa ao controle químico em patógenos e insetos causadores de prejuízos à agricultura vêm sendo feito há algum tempo (STADNIK, 2004), a literatura já faz referência ao uso de extratos vegetais com bioatividade contra algumas doenças e pragas de

plantas (GRAINGE e AHMED, 1988; ARNASAN et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 2005; MAGRO et al., 2006).

Nessa linha de pesquisa, trabalhos desenvolvidos com o objetivo de avaliar o efeito de extratos de meliáceas sobre *Alternaria solani* (J.E. Smith), revelaram a existência de espécies promissoras, como o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), planta amplamente dispersa no Brasil, que foi usada contra o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) em alface (RODRIGUES et al., 2007). Extratos de neen (*Azadirachta indica*), pimenta longa (*Piper anduncun*) e urtiga (*Urtiga dioica*) foram testados no controle de *Sclerotium rolfsii* e o extrato de *Urtiga dioica* reduziu significativamente o crescimento micelial deste fungo (BEZERRA et al., 2007); estes mesmos extratos foram testados contra *Corynespora cassiicola*, havendo redução significativa do crescimento micelial com os extratos de pimenta longa e neen (SILVA et al., 2007).

Algumas plantas do gênero *Arrabidaea* são estudadas por suas atividades medicinais e antifúngicas. *A. chica* conhecida popularmente como “crajiru” é uma planta medicinal conhecida popularmente por sua atividade anti-inflamatória e cicatrizante, cujos compostos foram estudados (ZORN et al. 2001), e *A. brachypoda* mostrou possuir em sua cera epicuticular substâncias que inibiram o crescimento do fungo *Cladosporium sphaerospermum* (ALCERITO et al., 2002).

Na região Norte a intoxicação por plantas daninhas de pastagens é responsável pela maioria das mortes de bovinos adultos. *A. bilabiata* conhecida como “gibata” ou “chibata” é a planta tóxica mais importante para herbívoros nas regiões de várzea da Bacia Amazônica e a segunda em importância em toda a região (TOKARNIA et al., 2004). Plantas produtoras de ácido monofluoracético como *A. bilabiata* (KREBS et al., 1994) são potencialmente perigosas, este ácido inibe o ciclo de Krebs com forte efeito tóxico no coração e no sistema nervoso central (TOKARNIA et al., 2002).

Outra abordagem é que plantas amazônicas produtoras de compostos tóxicos como *A. bilabiata* podem ser fontes potenciais de produtos com potencial atividade biológica, originando ativos para uso em fármacos ou

produtos para o controle de pragas de doenças de plantas (FONTANA et al., 2000).

Extratos de *A. bilabiata* foram testados no controle de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* e *Candida albicans*. Todos os isolados microbianos mostraram-se resistentes aos extratos, exceto *C. albicans*, sugerindo uma possível atividade antifúngica (GONZÁLEZ et al., 2000).

Os agrotóxicos usados no controle de doenças de plantas possuem riscos envolvidos na sua utilização como a toxicidade dos produtos e a possibilidade de contaminação do aplicador durante a aplicação; o manuseio incorreto destes produtos pode ocasionar sérios problemas à saúde humana, contaminação ambiental e dos consumidores que porventura venham a ingerir alimentos com resíduos de agrotóxicos.

A possibilidade de obter um produto natural, a partir de uma planta de ocorrência na região, próxima aos locais de plantio, poderia ser uma tentativa de obter uma ferramenta auxiliar no controle de fitopatógenos, minimizando a dependência de insumos externos e a contaminação de agricultores, consumidores e meio ambiente.

Este trabalho visou avaliar o efeito *in vitro* de concentrações dos extratos aquosos e etanólicos de *A. bilabiata* no controle de fungos fitopatogênicos.

Avaliar o crescimento micelial e produção de estruturas reprodutivas (esporos, conídios ou esclerócios) de *Colletotrichum guaranicola*, *Alternaria brassicae* e *Sclerotium rolfsii* e *Corynespora cassicola* em meio de cultura BDA com extratos aquosos ou etanólicos de *A. bilabiata*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados dos fungos *S. rolfsii* e *C. cassicola* para os experimentos foram cedidos pelo laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias, e obtidos a partir de folhas de plantas com sintomas típicos de

doenças causadas por estes fungos, coletadas em áreas de produtores rurais, em Manaus (AM).

O teste dos extratos de *A. bilabiata* foi realizado em três ensaios separados, um ensaio preliminar com concentração única (2%) de extrato aquoso autoclavado, um ensaio com concentrações de extrato aquoso filtrado em filtro bacteriológico e um ensaio com concentrações de extrato etanólico.

A coleta do material vegetal para os experimentos foi feita nos municípios de Autazes e Itacoatiara (Tabela 1).

Locais de coleta	Coordenadas geográficas	Experimentos realizados
Ramal AZ2, Km 5, margem direita, Autazes, AM.	S 03° 41' 34,8" WO 59° 07' 24,7"	Extrato aquoso autoclavado Extrato aquoso filtrado
Lago do Canaçari, Itacoatiara, AM.	S 03° 02' 704' WO 58° 25' 389"	Extrato etanólico

Tabela 1. Locais de coleta de *Arrabidaea bilabiata* para os experimentos com extratos aquosos e alcóolicos, Manaus, 2010.

3.2.1 Ensaios com extrato aquoso

3.2.1.1 Obtenção do extrato aquoso autoclavado

Após a coleta, as folhas de *A. bilabiata* foram levadas ao laboratório, lavadas em água corrente e secas em estufa de ventilação forçada à temperatura de 37° C.

Para a obtenção do extrato aquoso autoclavado (EA) foi utilizado o limbo foliar sem as nervuras, o qual foi fragmentado até atingir aproximadamente 1 mm de diâmetro. Foram utilizados 5 g de folha moída, para o preparo do EA, que foi obtido por infusão em 250 mL de água destilada, originando um extrato com concentração de 2% (v/v). A mistura foi agitada durante dez minutos e deixada em repouso durante 48 horas. Decorrido este tempo o extrato foi filtrado primeiramente em gaze por duas vezes e em papel de filtro Whatman nº 1 por três vezes para ser utilizado no preparo do meio de cultura para o cultivo do fungo.

O meio de cultura utilizado foi o BDA básico, preparado com 250 mL de caldo de batata e 250 mL de extrato vegetal, obtendo-se 500 mL de meio de cultura com extrato vegetal (acrescido de 10 g de dextrose; 10 g de ágar, e antibiótico cloranfenicol em 125 mg/L), que foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a uma temperatura de 120° C.

Após a esterilização e resfriamento do meio até aproximadamente 37 ° C, este foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar). Após a solidificação foi depositado no centro da placa, um disco de meio de cultura de cerca de 5 mm de diâmetro, contendo a colônia do fungo. A testemunha constou do cultivo do patógeno em meio BDA preparado sem extrato da planta.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com dois tratamentos (com extrato e sem extrato) e dez repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

3.2.1.2 Obtenção do extrato aquoso filtrado

Foram usadas 100 g de folhas moídas de *A. bilabiata*, para o preparo do extrato aquoso filtrado (EF), que foi obtido por infusão em 2000 mL de água destilada. A mistura foi agitada durante 10 minutos e deixada em repouso durante 48 horas. Decorrido este tempo o extrato foi filtrado em gaze por duas vezes e em papel de filtro Whatman nº 1 por três vezes e usado no preparo do meio de cultura para o cultivo do fungo.

As concentrações utilizadas para o EF em relação v/v do BDA e do extrato foram: 0% (controle), 5% (12,5 mL de extrato), 10% (25 mL de extrato), 20% (50 mL de extrato) e 40% (100 mL de extrato).

O meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) (200 g de batata, 12 g de dextrose e 12 g de ágar) foi preparado como de rotina, um dia antes da montagem do ensaio experimental e esterilizado por autoclavagem (121 ° C/15 minutos).

No dia da montagem do experimento, o BDA foi fundido em microondas e adicionou-se o extrato, esterilizado por filtração em filtro Milipore 0,45 µm. O meio foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, em ambiente

asséptico (câmara de fluxo laminar). Após a solidificação foi depositado no centro da placa, uma estrutura fúngica (escleródio (*S. rolfsii*) ou disco de 5mm de colônia (*C. cassicola*)), para avaliar o crescimento micelial do fungo. O controle constou do cultivo do patógeno em meio BDA sem o extrato vegetal.

Foram realizados dois ensaios, separadamente, um para cada patógeno avaliado (*S. rolfsii* e *C. cassicola*). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com cinco tratamentos (0%, 5%, 10% 20% e 40%) e dez repetições, sendo cada unidade experimental representada por uma placa de Petri.

3.2.1.3 Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos patógenos dos ensaios com extrato aquoso autoclavado e filtrado

Para os ensaios com EA e EF, a avaliação do efeito do extrato vegetal no crescimento micelial foi feita todos os dias, pela medição do comprimento e largura das colônias, utilizando-se uma régua milimetrada, até todos os tratamentos alcançarem a borda da placa. Imediatamente depois de encerrada a avaliação do crescimento micelial, iniciou-se a avaliação da produção de escleródios e esporos produzidos pelos fungos, por meio da contagem do número produzido em cada tratamento em hemacitômetro.

Para isso foi preparada uma suspensão, adicionando-se 40 mL de água destilada esterilizada em cada placa, e usou-se um pincel de cerdas macias para remover as estruturas dos conidióforos liberando-os na suspensão, que foi coletada em um béquer e agitada por 30 segundos. Uma alíquota (cerca de 10 µL) foi retirada e colocada no hemacitômetro para proceder à contagem dos escleródios e esporos em microscópio ótico com objetiva de 40X.

No ensaio com EA, os dados foram analisados estatisticamente pela análise da variância, usando os testes F e Scott-Knott a 5% de probabilidade para a comparação de médias com auxílio do programa estatístico SAEG 9.1.

No experimento com EF, os dados foram analisados estatisticamente pela análise da variância e as médias comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico SAEG 9.1. O ajuste das

equações foi feito com o auxílio do software *Table Curve* considerando: o ajuste dos dados originais e a explicação do fenômeno biológico.

3.2.2 Ensaio com extrato etanólico

3.2.2.1 Obtenção do extrato etanólico

O preparo prévio das folhas para a preparação do extrato foi feita da mesma maneira que no ensaio com extratos aquosos.

Após a secagem, as folhas foram moídas em moinho tipo Willye (TE 650) e armazenadas em sacos plásticos pretos no laboratório até a confecção dos extratos.

No preparo do extrato etanólico foram utilizadas 50 g de folhas moídas de *A. bilabiata*, colocadas em um Erlenmeyer de 250 mL de volume, imersas em 200 mL de álcool etílico absoluto por três dias.

Ao término desse período o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo e armazenado em recipiente apropriado até a evaporação total do solvente usado na extração. Este procedimento foi repetido três vezes. O extrato obtido foi armazenado em frascos de vidro cobertos com papel alumínio e armazenados em dessecador até a montagem dos experimentos.

3.2.3 Preparo do meio de cultura com os extratos vegetais

O meio de cultura usado foi o BDA básico. O BDA foi preparado como de rotina, e esterilizado por autoclavagem (121 ° C/15 minutos). O meio foi vertido em placas de Petri, em ambiente asséptico. Após a solidificação foi depositado, no centro da placa, um disco de meio de cultura, contendo a colônia dos fungos segundo o experimento. O experimento foi montado separadamente para cada espécie de fungo. Após a colocação do disco de micélio fúngico, as placas foram levadas à câmara de incubação para crescimento da colônia por 48 hs à temperatura de 27° C.

Em cada placa contendo as colônias fúngicas foram feitos cinco poços de 0,5 cm de diâmetro, aos quais adicionou-se, individualmente, diferentes concentrações do EE de *A. bilabiata*. As concentrações utilizadas nos experimentos foram: 0,0; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mg/mL de extrato alcoólico em etanol absoluto. O extrato concentrado foi pesado em balança de precisão Tecnal Mark 210 A, colocado em um microtubo de 1,5 mL e diluído em 1 mL de etanol absoluto por agitação em um vórtex. As placas de Petri foram incubadas à 27 ° C em B.O.D e o tratamento-controle foi constituído do meio BDA sem extrato.

3.3 Avaliação do crescimento micelial dos patógenos do ensaio com extrato etanólico

A avaliação foi feita todos os dias, pela visualização do crescimento das colônias na placa até todos os tratamentos alcançarem a borda da placa. Em caso de formação de halo de inibição este halo seria medido com régua milimetrada.

No decorrer do experimento, após repetir por duas vezes o ensaio para cada fungo e detectar que não houve inibição do crescimento micelial, as concentrações de extratos aplicadas às placas foram triplicadas (0; 1,5; 2,25; 3 e 4,5 mg/mL) para avaliar um possível efeito inibitório. O novo ensaio com as concentrações triplicadas foi repetido duas vezes.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Ensaio com extratos aquosos

3.4.1.1 Ensaio com extrato aquoso autoclavado

Não houve diferença significativa entre o controle e as placas com extrato aquoso autoclavado (EA) a 2% ($P < 0,05$) para as médias dos diâmetros dos fungos das espécies *S. rolfsii* e *A. brassicae* (Tabela 2), demonstrando que

o EA de *A. bilabiata* na concentração testada não interferiu no crescimento micelial destas espécies.

Para a espécie *C. cassicola* houve maior crescimento micelial nas placas com meio de cultura com o EA (Tabela 2), em relação ao controle, com diferenças significativas sugerindo que o uso do extrato de *A. bilabiata* na concentração testada teve um efeito promotor no crescimento deste fungo.

Para *C. guaranicola* houve diferença significativa, com menor crescimento fúngico no meio com o EA (Tabela 2), o que mostra um possível potencial deste extrato como método de controle alternativo para esse fungo que tem de ser avaliado *in vivo*, pois deve ser considerado o aumento de esporulação ocorrido no experimento.

	Extrato	Controle
Fungos	Diâmetro (cm)	Diâmetro (cm)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	9.00 a	9.00 a
<i>Alternaria brassicae</i>	8.66 a	8.13 a
<i>Colletotrichum guaranicola</i>	8.91 b	8.99 a
<i>Corynespora cassicola</i>	8.61 a	7.85 b

* Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Médias do diâmetro das colônias dos fungos fitopatogênicos avaliados quanto ao efeito do extrato aquoso autoclavado (EA) de *Arrabidaea bilabiata* no crescimento micelial. Manaus, 2010.

Para a contagem de esporos (conídios) houve diferença significativa para os três fungos testados entre o controle e o tratamento com EA de *A. bilabiata*.

Para *A. brassicae* e *C. cassicola* houve redução no número de esporos (Scott-Knott 5%) nos tratamentos com EA em relação ao controle, já para *C. guaranicola* o tratamento com extrato de *A. bilabiata* estimulou a esporulação do fungo (Tabela 3) o que é indesejável por aumentar a quantidade de inóculo do patógeno no campo.

O tratamento com EA de *A. Bilabiata* reduziu a esporulação de *C. cassicola* em 42,35% e em *A. brassicae* em 68,21% em comparação com o controle sem extrato (Tabela 3).

	Extrato	Controle
Fungos	Número de esporos/mL	
<i>Alternaria brassicae</i>	1247,50b	3924,25a
<i>Colletotrichum guaranicola</i>	130,88a	43,50b
<i>Corynespora cassiicola</i>	6258,40b	10855,00a

* Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Produção de esporos de fungos fitopatogênicos avaliados quanto ao efeito do extrato aquoso autoclavado (EA) de *Arrabidaea bilabiata* no crescimento micelial. Manaus, 2010.

Ribeiro e Bedendo (1999) testaram extrato de alho no controle de fungos fitopatogênicos e notaram que o extrato esterilizado através de filtração em filtro bacteriológico apresentou atividade antifúngica, contrariamente ao extrato autoclavado, o que pode evidenciar a presença de princípio ativo termosensível que teria se perdido durante o processo de autoclavagem.

Outros trabalhos fazem referência à diferença encontrada em testes com extratos vegetais autoclavados e não autoclavados. Em testes de extrato aquoso de *Artemisia camphorata* Vill. (cânfora) sobre a germinação de esporos de *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, Franzener et al. (2003) notaram que houve diferença no efeito antifúngico deste extrato, pois o extrato autoclavado não inibiu a germinação, enquanto o extrato não autoclavado inibiu em até 20%.

Bonaldo et al. (2004) avaliando a germinação de esporos em *C. lagenarium* com extratos aquosos de *Eucalyptus citriodora* não obtiveram diferença significativa entre os extratos autoclavado e não autoclavado na concentração de 1%, porém à partir de 5% do extrato aquoso autoclavado houve mais de 90% de inibição na germinação de esporos e para o extrato não autoclavado a inibição foi de 75% evidenciando que a autoclavagem do extrato promoveu maior inibição da germinação do patógeno. Já o extrato autoclavado de *E. citriodora* na concentração de 0,1% promoveu maior esporulação em *C. lagenarium*.

Os resultados de Bonaldo et al. (2004) são consistentes com os obtidos neste experimento, pois com a concentração de 2% de EA de *A. bilabiata*

houve redução de 42,35% na germinação de esporos de *C. cassicola* e de 68,21% em *A. brassicae* em comparação com o controle sem extrato. Já para *C. guaranicola*, microorganismo pertencente ao mesmo gênero do *C. lagenarium*, houve maior esporulação em comparação com o controle sem extrato.

Itako et al. (2008) testando extratos autoclavados de várias espécies medicinais (*Achillea millefolium* (mil-folhas), *Artemisia camphorata* (cânfora), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim)) no crescimento micelial, germinação e esporulação de conídios de *A. solani*, observaram que o crescimento micelial de *A. solani* foi igual ou superior à testemunha para todos os extratos brutos autoclavados testados, indicando que os extratos não impediram o crescimento do fungo *in vitro*. Resultado semelhante ao obtido neste trabalho, pois para as espécies *S. rolfsii* e *A. brassicae* não houve diferença significativa entre o controle e o tratamento com EA a 2% ($P < 0,05$) para o crescimento micelial. Já para a espécie *C. cassicola* houve diferença significativa com um maior crescimento micelial nas placas com meio de cultura com o extrato vegetal em relação ao controle.

Celoto et al. (2008) testaram extratos aquosos e hidroalcoólicos de 20 espécies medicinais no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* e obtiveram para os extratos não autoclavados de eucalipto (*E. citriodora*) e de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) porcentagens de inibição do crescimento micelial entre 62 e 70%, repectivamente. Estes autores verificaram a existência de diferenças significativas na porcentagem de inibição de *C. gloeosporioides*, em função do tipo de esterilização usado (autoclavagem ou filtração). Os autores fizeram menção ao fato de que os extratos autoclavados têm tendência a apresentar menor atividade antifúngica, o que indica que as condições de autoclavagem poderiam alterar as substâncias antifúngicas, e relataram a existência de grande diferença de resultados entre os trabalhos realizados com extratos vegetais (CELOTO et al., 2008).

Balbi-Peña et al. (2006) esclareceram que a termoestabilidade de compostos químicos em plantas está na dependência direta da espécie, o que

explica a diferença obtida em experimentos entre extratos autoclavados e filtrados, onde algumas vezes a autoclavagem dos extratos diminui seu efeito e outras ocorre o contrário.

3.4.1.2 Ensaio com extrato aquoso filtrado

O extrato aquoso filtrado (EF) não demonstrou propriedades fungitóxicas no crescimento micelial de *C. cassicola* (Figura 1) mesmo nas concentrações mais elevadas. Para *S. rolfsii* (Figura 1) houve redução do tamanho da colônia da ordem de 50% na concentração de 40% de EF de *A. bilabiata* em relação ao controle.

No experimento com EF de *A. bilabiata* para a espécie *C. cassicola* os resultados são semelhantes aos obtidos no experimento com EA, com maior crescimento micelial nos tratamentos com EF de *A. bilabiata*. Em *S. rolfsii* os resultados diferem dos obtidos no experimento com EA de *A. bilabiata*, onde não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos com EA.

Este resultado está de acordo com resultados obtidos em outros trabalhos, onde houve diferenças entre a inibição do crescimento micelial entre extratos autoclavados e filtrados (RIBEIRO e BEDENDO, 1999; FRANZENER et al., 2003; BONALDO et al., 2004; CELOTO et al., 2008; ITAKO et al., 2008), com a tendência de algumas vezes o extrato autoclavado possuir menor efeito em comparação com o extrato filtrado (CELOTO et al., 2008).

Amaral e Bara (2005) obtiveram resultado semelhante ao obtido neste experimento para *C. cassicola*, com o extrato alcóolico de coração de negro (*Albizzia lebeck* Benth, Leguminosae) pois obtiveram em *S. Rolfsii*, um maior crescimento micelial nos tratamentos com extrato vegetal, o que sugere a existência de alguma substância ativadora para o crescimento deste fungo no extrato de coração de negro.

Tagami et al. (2009) testaram extratos de *Bidens pilosa* (picão preto), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Lippia alba* (erva cidreira) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) no crescimento de *S. Rolfsii* obtiveram reduções do crescimento micelial que variaram de cerca de 10 a 50% para os diferentes extratos

vegetais com 40% do extrato no meio de cultura, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Segundo Lo et al. (1996) o efeito de extratos vegetais sobre fungos pode estar relacionado com a presença de fitoalexinas que podem ter efeito danoso às células fúngicas como a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, que refletem na inibição da germinação, na redução ou inibição do crescimento micelial.

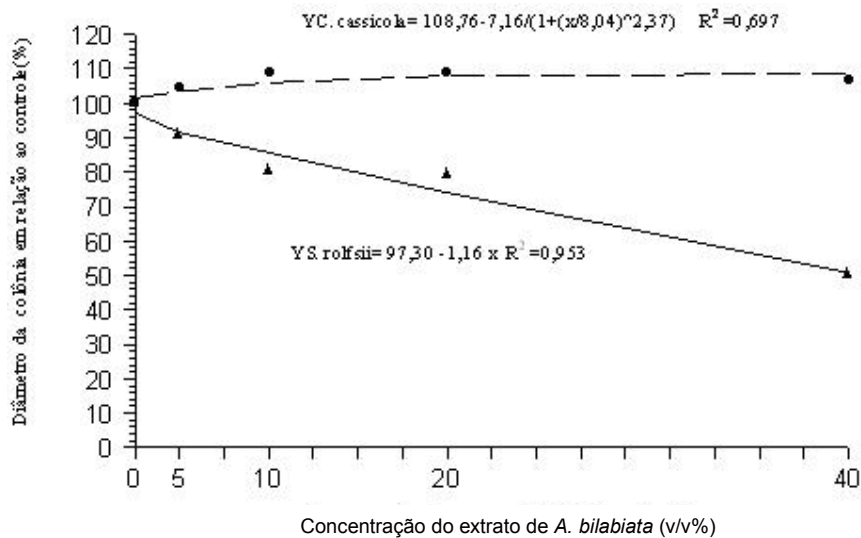


Figura 1. Diâmetro das colônias (crescimento micelial) de *Corynespora cassicola* e *Sclerotium rolfsii* em meio de cultura com extrato filtrado (EF) de *Arrabidaea bilabiata*.

A maior produção de escleródios em *S. rolfsii* nos diferentes tratamentos quando comparado com o controle (Figura 2), sugere um efeito estimulante do EF na produção destas estruturas fúngicas.

Em *C. cassicola* houve redução na esporulação, os efeitos mais notórios foram observados nas concentrações 20 e 40% sendo a esporulação reduzida em até 62 e 70% respectivamente, em relação ao controle (Figura 2). Para as demais concentrações (5 e 10%), não houve efeito do EF na produção de esporos.

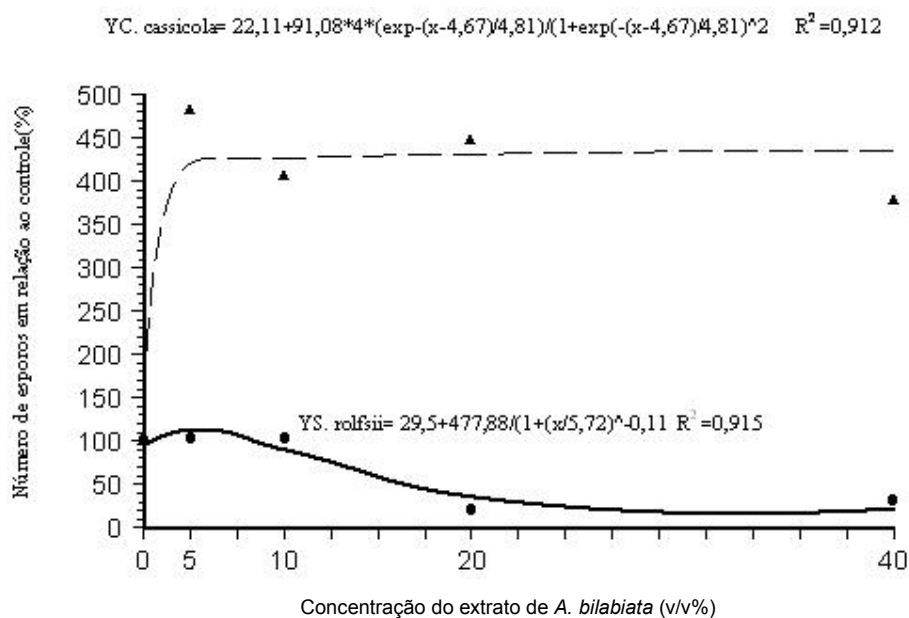


Figura 2. Número de esporos e esclerócios de *Corynespora cassicola* e *Sclerotium rolfsii* em meio de cultura com extrato filtrado (EF) de *Arrabidaea bilabiata*.

Resultados similares foram também obtidos por Balbi-Peña et al. (2006), que testaram extratos de cúrcuma longa e obtiveram redução de esporulação de 71,7% (10% do extrato no meio de cultura) e de até 87% (15% do extrato no meio de cultura) em *Alternaria solani* e somente 23,2% de inibição do crescimento micelial (15% de extrato no meio de cultura); demonstrando segundo estes resultados, que a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de cúrcuma para *A. solani* se baseou mais na inibição da esporulação, e em menor grau no crescimento micelial.

A redução de esporulação no ensaio com *C. cassicola*, pode estar relacionada à atividade biológica dos compostos secundários presentes no extrato de *A. bilabiata* e ao princípio tóxico da mesma.

Estudo realizado na Venezuela identificou glicosídeos do tipo esteróides cárdio-ativos, foi demonstrada ainda a presença de ácido monofluoracético nas folhas de *A. bilabiata* (KREBS et al., 1994; GONZALEZ et al., 2000).

3.4.2 Ensaio com extrato etanólico

Para os fungos *S. rolfsii* e *C. cassiicola* não houve inibição do crescimento micelial nas concentrações utilizadas no experimento com EE de *A. bilabiata*. O crescimento das colônias tomou toda a placa de Petri sem formação de halo de inibição, mesmo após a repetição dos experimentos com as concentrações padrão e as concentrações triplicadas, não foi possível avaliar nenhuma diferença entre o crescimento da colônia em relação aos poços contendo as diferentes concentrações em relação ao controle (Figura 3).



Figura 3. Crescimento micelial de *Corynespora cassiicola* no experimento com extrato alcóolico de *Arrabidaea bilabiata* em diferentes concentrações. Foto: Luciana Souza

O experimento foi repetido por duas vezes para cada um dos fungos testados, e posteriormente para tentar obter alguma inibição no crescimento micelial dos fungos as concentrações de extrato foram triplicadas, porém nem assim houve formação de halo de inibição.

O resultado com o EE de *A. bilabiata* foi análogo ao resultado do experimento com EA de *A. bilabiata*, o qual também não causou redução no crescimento micelial de *S. rolfsii*; porém promoveu maior crescimento micelial para *C. cassiicola*. Já o experimento com EF de *A. bilabiata* reduziu em 50% o crescimento micelial de *S. rolfsii* na concentração de 40% de extrato

no meio de cultura, não causando nenhum efeito fungitóxico no crescimento micelial de *C. cassicola*.

O uso de extratos etanólicos e hidroetanólicos já obteve sucesso indicando o potencial desses extratos em vários fitopatógenos, Viana et al (2008) usaram extrato etanólico de *S. alata* no controle do fungo *Monosporascus cannonballus*, um dos fitopatógenos envolvidos na síndrome do colapso do meloeiro, obtiveram porcentagens de inibição do crescimento micelial de 28,6% (caule), 36,7% (raiz) e 27,99% (vagem) na concentração de 500 ppm. Os autores também realizaram experimentos no campo e obtiveram porcentagem de controle deste fitopatógeno semelhante às porcentagens obtidas pelos fungicidas químicos comerciais.

Algumas vezes os resultados diferem de acordo com a espécie vegetal usada, Celoto et al. (2008) testaram o extrato hidroetanólico de 20 espécies no controle de *C. gloeosporioides* e obtiveram as maiores porcentagens de inibição para eucalipto (*E. citriodora*) de 70,5% e melão de são caetano (*Momordica charantia* L.) de 62,5%, as menores porcentagens de inibição para capim-cidreira (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) de 1,7% e seringueira (*Hevea* spp.) de 2,2%, e outros valores medianos para espécies como fumo (*Nicotiana tabacum* L.) de 25% e menstrato (*Peltodon radicans* Pohl) de 20,8%, com grande variação entre as espécies testadas.

Tequida-Meneses (2002) usaram extratos etanólicos de *Larrea tridentata* no controle de *Aspergillus niger* e obtiveram 77,3% de inibição no crescimento micelial, no mesmo experimento os autores obtiveram uma inibição de crescimento de 100% com extrato etanólico de *Datura discolor* sobre o fungo *Fusarium poae*. No mesmo experimento o extrato etanólico de *L. tridentata* causou 100% de inibição de crescimento para os fungos *F. poae* e *F. moniliforme*, o que demonstra que o etanol apresentou alta eficiência para extrair a(s) substância(s) antifúngica(s) desta espécie, ao contrário do que ocorreu com *A. bilabiata* no presente trabalho.

Cunico et al. (2002) testaram extratos etanólicos de *Maytenus licifolia* e obtiveram para o patógeno *F. oxysporum* inibição de 26% sobre o crescimento micelial do patógeno, enquanto no mesmo experimento o extrato etanólico de *M. licifolia* estimulou o crescimento micelial de *C. acutatum*.

Silva et al. (2009) testando extratos hidroetanólicos combinados de bulbilho de alho (*Allium sativum* L.) e folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.); cascas de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) e manjeriço, observaram que estes não inibiram o crescimento micelial do fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, porém o extrato de manjeriço proporcionou o menor crescimento fúngico dentre os extratos testados, indicando uma ação fungicida e inibitória para a espécie fúngica nas condições experimentais analisadas.

Souza, Araújo e Nascimento (2007) avaliaram a atividade antifúngica de extratos hidroetanólicos de alho (*A. sativum* L.) e capim-santo (*C. citratus* Stapf.) sobre o desenvolvimento de *F. proliferatum* e observaram que os menores crescimentos miceliais foram obtidos para os tratamentos com o extrato de alho a 5 e 10%, verificaram ainda que todas as concentrações avaliadas reduziram o crescimento do *F. proliferatum*, sendo a maior eficiência observada nas concentrações de 2,5%, 5,0% e 10,0%.

A literatura faz referência à possibilidade de fatores bióticos ou abióticos como: a genética, as condições de cultivo, a colheita e o processamento do material influenciarem os resultados de testes com extratos de plantas (CELOTO et al., 2008); existe um grande número de plantas que apresentam propriedades antifúngicas em seus extratos, porém essas propriedades são dependentes dos órgãos utilizados no preparo e da idade e estágio vegetativo da planta. A eficiência do extrato também depende da espécie envolvida, do tipo de patógeno e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação do extrato (SILVA et al., 2005).

É muito difícil comparar resultados obtidos em diferentes experimentos pois a atividade antifúngica pode variar devido a localização e influências ambientais ocorridas no local de origem da planta, além da variabilidade genética e da diferença nos métodos de extração, o uso de diferentes concentrações também pode interferir nos resultados obtidos causando variação (RANGANATHAN e BALAJEE, 2000; SOMCHIT et al., 2003; VIANA et al., 2008).

Neste trabalho, alguns destes fatores supra-citados podem ter contribuído para a não existência de atividade fungitóxica no EE de A.

bilabiata sobre *S. rolfisii* e *C. cassiicola*, pois as plantas usadas na elaboração dos extratos aquosos (filtrado e autoclavado) e etanólico foram coletadas em diferentes municípios do Estado do Amazonas, em virtude de uma queimada ocorrida no primeiro local de coleta na época da realização do experimento com EE.

O local de cultivo da planta pode ocasionar variação em resultados com testes de extratos vegetais. Outra questão diz respeito ao método de extração dos compostos com possível atividade antifúngica da espécie, pois alguns compostos tem solubilidade diferencial em água e em álcool.

Quanto as diferenças genéticas entre plantas, o estudo de variabilidade genética com marcadores AFLP realizado neste trabalho detectou a existência de variabilidade entre as plantas de *A. bilabiata* coletadas nos municípios de Autazes e Itacoatiara, tais considerações podem explicar a diferença de atividade antifúngica detectada entre os extratos aquosos e etanólicos de *A. bilabiata*.

Não se conhece com exatidão todos os componentes químicos de *A. bilabiata*, porém sabe-se que esta espécie possui em sua composição o ácido monofluoracético (KREBS et al., 1994; RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001), que é solúvel em água e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos (MEIJA, TOLEDO E RAMIREZ, 2008). Este ácido é um dos componentes ligados à toxicidade de *A. bilabiata* em bovinos (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001; TOKARNIA et al., 2007).

Se esta substância estiver ligada à redução do crescimento micelial de *S. rolfisii* e à redução de esporulação em *C. cassiicola* que ocorreu no experimento com EF de *A. bilabiata*, seria um indício de que, este composto altamente solúvel em água, teria sofrido algum grau de perda no processo de autoclavagem, ou que o etanol usado na elaboração do EE de *A. bilabiata* não seria capaz de extrair com eficiência esta substância.

3.5 Conclusões

O extrato aquoso autoclavado de *A. bilabiata* não mostrou atividade fungitóxica sobre o crescimento micelial de *S. rolffisi* e *A. brassicae*. Para *C. cassicola* o extrato aquoso autoclavado promoveu maior crescimento micelial, o único efeito do extrato de *A. bilabiata* sobre o crescimento micelial ocorreu em *C. guaranicola*.

O uso do extrato aquoso autoclavado causou a redução da esporulação de *C. cassicola*.

Quanto ao fungo *C. cassicola* o extrato de *A. bilabiata* nas diferentes formas de preparo e concentrações testadas nestes experimentos, não foi capaz de causar redução no crescimento micelial desta espécie.

A presença de propriedades antifúngicas no extrato filtrado de *A. bilabiata* demonstrou que este extrato pode ter potencial como alternativa de controle de *C. cassicola*.

A coleta das plantas de *A. bilabiata* para a realização dos extratos aquosos e etanólico em diferentes locais impossibilitou atribuir unicamente à menor solubilidade do(s) composto(s) presente(s) no extrato de *A. bilabiata* a inexistência de atividade antifúngica do extrato etanólico nas concentrações testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUÇÃO GERAL

ADIN, A. et al. Genetic differentiation and trade among populations of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in the Peruvian Amazon - implications for genetic resource management. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.108, n. 8, p. 1564-1573, May 2004.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.

ALI, G. M.; YASUMOTO, S.; SEKI-KATSUTA, M. Assessment of genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.) detected by Amplified Fragment Length Polymorphism markers. **Electron. J. Biotechnol.**, Valparaíso, v. 10, n. 1, Jan. 2007.

ALONSO-AMELOT, M.E. et al. Bracken ptaquiloside in milk. **Nature**. v. 382, p. 587-587. 1996.

ALONSO-AMELOT, M.E.; AVENDANO, M. Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: an epidemiologic study. **Int. J. Câncer**. n. 91, p. 252-259. 2001.

ALZATE-MARIN, A.L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatol. Bras.** v. 30, n. 4, p. 333-342, jul - ago 2005.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmacia**, Supl. v. 2, n. 2, p. 5-8. 2005.

AMSELLEM, L. et al. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 4, p. 443-455. 2000.

ANDRADE, R. A. de et al. . Detection of polimorphism in rootstocks for citrus. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, Aug. 2007.

AREIAS, R. G. B. M. et al. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores rapd e acúmulo de proteína nos grãos. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.1, p.19-28, 2006.

ARNAO, E. et al. Aflp markers in the evaluation of genetic diversity of rice varieties and elite lines in venezuela. **INCI**, v.33, n.5, p.359-364, 2008.

- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatol. Bras.** v. 29, n. 5, p. 555-557. 2004.
- BELLON, G. et al. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores rapd. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 197-202. 2009.
- BENTES, J. L. S.; BARRETO, R. W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. agente causal da antracnose do guaranzeiro. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 129-131. 2004.
- BENTES, J. L.S.; MATSUOKA, K. Histology of *Colletotrichum guaranicola* and *Paullinia cupana* var. *sorbilis* on resistant and susceptible clones. **Fitopatol. bras.**, v. 27, n. 1, p. 71-77. 2002.
- BLAZQUEZ, C. H. Target spot. In: JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. (Ed.). **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, 23 p. 1991.
- BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptos citriodora*. **Fitopatol. Bras.**, v. 29, n. 2, p. 128-134. 2004.
- BONIN, A; EHRICH, D.; MANEL, S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, n.18, p.3737-3758, 2007.
- BOWERS, J. H.; LOCKE, J. C. Effect of Formulated Plant Extracts and Oils on Population Density of *Phytophthora nicotianae* in Soil and Control of Phytophthora Blight in the Greenhouse. **Plant Disease**, v. 88, n. 1, p. 11-16. 2004.
- CAUPER, G. C. de B. **Biodiversidade amazônica - flora amazônica - vol. III**. Manaus, Amazonas. Centro Cultural dos Povos da Amazônia, 2006. Disponível em: http://www.povosdamazonia.am.gov.br/pdf/bio_vol13.pdf. Acesso em: 20/05/2007.
- COSTA, C.P.R.; LIMA, A.E. Brazilian-Sino Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Rio de Janeiro. 1989.
- CUNICO, M.M. et al. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart.ex Reiss., Celastraceae. **Rev.Bras. Farmacogn.**, v.12, n.2, p.69-73, 2002.
- DIXON, R. A. Engineering natural product pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n 3, p.329-336, 2005.

DÖBEREINER J.; TOKARNIA, C. H.; SILVA, M. F. Intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em bovinos na Região Amazônica do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 17-24. 1983.

_____; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em coelhos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 89-96. 1984.

EMBRAPA - Embrapa Amazônia Ocidental. **Cultura do Guaranazeiro no Amazonas: Sistema de produção 1** (versão eletrônica). 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Guarana/Cultivo doGuaranazeiroAM/podas.html>. Consultado em: 22/10/2010.

FAO. **El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001: Parte III - Los efectos económicos de las plagas y enfermedades transfronterizas de los animales y las plantas**. Colección FAO: Agricultura n. 33, Roma, 2001. 295 p.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.

GAVA A. et al. Mortes súbitas em bovinos causadas pela ingestão de *Mascagnia* sp. (Malpighiaceae), no Estado de Santa Catarina. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 1, p.16-20, 1998.

GIMENES, M. A.; LOPES, C. R.; VALLS, J. F. M. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 25, n. 3, 2002.

GONZÁLEZ, B. et al. Chemical Composition And Biological Activity Of Extracts From *Arrabidaea Bilabiata*. **Pharmaceutical Biology**. v. 38, n. 4, p. 287-290. 2000.

HABERMEHL, G. Poisonous plants of Brazil: review article. **Toxicon**, v. 32, n. 2, p. 143-156. 1994.

_____; Highlights on plant toxins in **Toxicon**. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 341-344, 2004.

HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 37-39, 2003. (Palestra)

HARBORNE, J.B., BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. Taylor & Francis, London. 1995.

IB - USP. **Disciplina Recursos Econômicos Vegetais. Texto base 06 - Plantas Tóxicas**, 2007. Disponível em: http://felix.ib.usp.br/bib141/Textos_Aulas/T6_PT.PDF. Acesso em: 10/03/2010.

- JABOUR, F. F., et al. Variação da toxidez de *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em coelhos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 3, 2006.
- JAMES L.F. et al. **Plant toxicants in milk**, p.83-88. In: Colegate S.M.; Dorling P.R. (ed.) *Plant Associated Toxins*. CAB International, Wallingford. 1994.
- KARAM, D. et al. Genetic diversity among proso millet (*Panicum miliaceum*) biotypes assessed by AFLP technique. **Planta daninha**. v. 22, n.2, p. 167-174. 2004.
- KREBS H.C.; KEMMERLING W.; HABERMEHL G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravi* by F-19-NMR Spectroscopy. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 909-913. 1994.
- KUHN, O. J. et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, jan./mar. 2006.
- LOPES, R. et al. Marcadores moleculares dominantes (Rapid e Aflp). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 64-68. 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/marcadores.pdf>>. Acesso em: 08/07/2007.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; RESENDE JUNIOR, M. F. R. de. Tombamento de mudas de espécies florestais causado por *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, Aug. 2007.
- MAGRO, A. et al. Efficacy of plants extracts against stored products fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, p. 176-178. 2006.
- MALONE, G. Et al. Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no estado do rio grande do sul. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, América do Norte, 37 8 10 2007.
- MARÇAL, W.S. A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 24, n. 1, p. 197-208. 2003.
- MARTINS, M. V. V. et al . Erradicação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* em substratos tratados em coletores solares, em Campos dos Goytacazes-RJ. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, Dec. 2003.
- MICHEREFF, S. J. et al . Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no Estado de Pernambuco. **Fitopatol. bras.**, v. 28, n. 6, p. 656-663. 2003.
- MILEO, L.J. et al . Plantas daninhas hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* em cultivos de guaraná no Estado do Amazonas. **Planta daninha**, v. 25, n. 4, p. 771-782. 2007.

MUHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. *Sci. agric.*, Piracicaba, v. 57, n. 2, June 2000.

MURTAZA, N.. Cotton genetic diversity study by AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 4. 2006. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.equipu.cl/index.php/ejbiotechnology/article/view/v9n4-9/344>. Consultado em: 28/07/2010.

O'HANLON, P.C., PEAKALL, R., and BRIESE, D. T. AFLP reveals introgression in weedy *Onopordum* thistles: hybridization and invasion. *Molecular Ecology*. v. 8, p. 1239-1246. 1999.

OLIVEIRA, P. R. D. et al. Análise da diversidade genética por aflp e identificação de Marcadores associados à resistência a doenças em videira. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 3, p. 454-457, 2005.

OLIVEIRA, R. R. et al . Reação de híbridos de pepino para cultivo protegido a isolados de *Corynespora cassiicola*. *Fitopatol. bras.*, Brasília, v. 31, n. 5, Oct. 2006.

_____ et al . Patogenicidade de isolados de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Summa phytopathol.*, Botucatu, v. 33, n. 3, Sept. 2007.

ORTIZ, E. B. Causas de muerte subita en bovinos en pastoreo en las sabanas, de América Tropical. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 17, n.2, p. 182-192, 2004.

PANTER K. E.; JAMES L.F. Natural plant toxicants in milk: a review. *J.Anim. Sci.*, v. 68, p. 892-904, 1990.

PAULETTI P. M et al. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (bignoniaceae). *Quim. Nova*, v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003.

PEREIRA, A. V. et al. Diversidade genética entre acessos de capim-elefante obtida com marcadores moleculares. *R. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 37, n. 7, 2008.

PERUCH, L. A. M.; MICHEREFF, S. J.; ARAUJO, I. B. Levantamento da intensidade da alternariose e da podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. *Hortic. Bras.*, v. 24, n. 4, p. 464-469. 2006.

PESTER, T. A. et al. Genetic Diversity of Jointed Goatgrass (*Aegilops cylindrica*) Determined with RAPD and AFLP Markers. *Weed Science*, v. 51, n. 3, p. 287-293. 2003.

POSER, G. L. von et al. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochem. Syst. Ecol*, v 28, n. 4, p.351-366. 2000.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. *Scientia Agrícola*, v. 56, n. 4, p. 1267-1271. 1999. Supl.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, p. 38-42, 2001.

RIET-CORREA F. et al. **Toxic plants for livestock in Brazil: Economic impact, toxic species, control measures and public health implications**, p.2-14. In: Panter K.E., Wierenga T.L. & Pfister J.A. (Eds), *Poisonous Plants: Global research and solutions*. CAB International, Wallingford. 2007.

RODRIGUES, E et al. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. *Summa Phytopathologica*, v.33, p. 20-24, 2007.

ROSSITER, J. G. de A. et al . Seleção de genótipos de aceroleira assistida por marcadores isoenzimáticos visando à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 2. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 30, n. 4, Dec. 2008.

ROZWALKA, L. C. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. *Ciência Rural*, v.38, n.2, p. 301-307, mar-abr, 2008.

SALLA, M. F. S. et al. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, v. 24, n. 1, Apr. 2002.

SANTOS, I. P. et al . Ocorrência de mancha alvo, causada por *Corynespora cassicola*, em alface cultivado em hidroponia no Brasil. *Summa phytopathol.*, Botucatu, v. 33, n. 4, Dec. 2007.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E. da S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta*, v.30, p.129-137, 2000.

SEAWRIGHT A.A. **Toxic plants residues in milk**, p.77-82. In: Colegate S.M.; Dorling P.R. (ed.) *Plant Associated Toxins*. CAB International, Wallingford. 1994.

SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no Estado do Maranhão. *Fitopatol. bras.*, Brasília, v. 30, n. 1, Feb. 2005.

SILVA, D. M. da; et al. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.** v.26, n. 4, p. 223-236, 2006.

SILVA, I. D. et al. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 35, n. 2, p. 109-115. 2005.

SINGH, R. K. et al . SSR and AFLP based genetic diversity of soybean germplasm differing in photoperiod sensitivity. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 33, n. 2, 2010.

SOARES, R. M; GODOY, C. V; OLIVEIRA, M. C. N. de. Diagrammatic scale for severity evaluation of soybean target spot. **Trop. plant pathol.**, Brasília, v. 34, n. 5, Oct. 2009.

SOUSA, C. S. de et al . Divergência genética entre genótipos de alface por meio de marcadores AFLP. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, 2007.

SOUZA, A. E. F., ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L.C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatol. Bras.**, v. 32, n. 6, p. 465-471. 2007.

STACHETTI, R. G., PUIGNAU, J. P. Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario del Cono Sur., Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture., & Seminario Internacional sobre Racionalización del Uso de Pesticidas en el Cono Sur. **Racionalización del uso de pesticidas en el Cono Sur.** Montevideo, Uruguay: IICA. 1998. 89 p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=KccOAQAIAAJ&oi=fnd&pg=PA43&dq=perdas+por+doen%C3%A7as+na+agricultura&ots=gTrDUBi6Sb&sig=Pdt2F16jesRO8LxUCvJsJyZwBEM#v=onepage&q=perdas%20por%20doen%C3%A7as%20na%20agricultura&f=false> Consultado em: 18/08/2010.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência** v.11, p. 16-21, 1999.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A. p. 309-344, 2004.

TEQUIDA-MENESES, M. et al. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium poae*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.19, p.84-88, 2002.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. Alternariose em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo integrado. 2006. Disponível em:

http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/Alternariose/Index.htm.
Consultado em: 12/08/2010.

TOKARNIA C.H., PEIXOTO P. V.; DÖBEREINER J. Poisonous plants affecting heart functions of cattle in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** v, 10, p. 1-10, 1990.

_____. et al., 1998. Intoxicação experimental em coelhos por *Mascagnia* sp. (Malpighiaceae) procedente do Estado de Santa Catarina. **Pesq. Vet. Bras.** v.18, n. 2, p. 61-64, 1998.

_____; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA, 1979. 95 p. il.

_____; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Helianthus, 2000. 320 p. il.

_____. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40. p. 1635-1660. 2002.

_____ et al. Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos comparados da intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em búfalos e bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, 2004, v. 24, n. 2, p. 74-79.

_____. et al. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. 2ª. Ed. Manaus: INPA, 2007. 97 p. il.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995, 175p.

UEDA, M. et al. Extrato etanólico obtido do composto exaurido de *agaricus blazei* no crescimento, esporulação e germinação in vitro de *corynespora cassicola* e na indução da enzima peroxidase em plantas de pepino “japonês”. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 7, n. 1-2, p. 65-73. 2008. Disponível em: <http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/2053/1624>.
Consultado em: 18/09/2010.

VAN ANDEL, T. et al. The Medicinal Plant Trade in Suriname. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 5, p. 351-372. 2007. Disponível em: <http://www.erajournal.org/ojs/index.php/era/article/view/141/126>.
Consultado em: 15/08/2010.

VAN ANDEL, T.; HAVINGA, R. Sustainability aspects of commercial medicinal plant harvesting in Suriname. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 8, p. 1540-1545. 2008.

VERPOORTE, R. e MEMELINK, J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13 n° 2, p.181-187.

VERZIGNASSI, J. R. et al. Epidemias de Mancha de *Corinespora* em Pepino “Tipo Japonês” sob Cultivo Protegido na Região Norte do Estado do Paraná. **Fitopatol. Bras.**, v.4, n. 5, p.570, 2003.

_____; POLTRONIERI, L. S.; BENCHIMOL, R. L. Mancha-alvo em mogno-africano no Brasil. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 35, n. 1, Feb. 2009.

VETTER, J. A biological hazard of our age: Bracken fern [*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn] - A review. **Acta Veterinaria Hungarica.** v. 57, n. 1, p. 183-196, 2009.

VIEIRA, E. S. N. et al . Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Rev. bras. sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, 2009.

VILELA, H. **Pastagem: seleção de plantas forrageiras, implantação e adubação.** Viçosa: Aprenda Fácil Ed, 2005. 283 p.

VOS, P., et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

YANAKA F. Y. et al. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Poaceae) com Base em Isoenzimas e Marcadores RAPD. **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.6, p.1897-1904, 2005.

YAQUB F., SHAHZAD S. Effect of fungicides on in vitro growth of *Sclerotium rolfsii*. **Pak. J. Bot.** v. 38, n. 3, p. 881-883. 2006.

ZHANG, Han Yao et al . Genetic Diversity among Flue-cured Tobacco Cultivars Based on RAPD and AFLP Markers. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 51, n. 6, Dec. 2008.

CAPÍTULO 2

ANDRADE, R. A. de et al . Detection of polymorphism in rootstocks for citrus. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, Aug. 2007.

AYALA, F.J. Population and Evolutionary Genetics. A Primer. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Parc, California. 268p.1982.

BELLON, G. et al . Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores rapd. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, Mar. 2009 .

BERTONI, B. W. Et al. Genetic diversity in natural populations of *Jacaranda decurrens* Cham. determined using RAPD and AFLP markers. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 33, n. 3, 2010.

BUTTOW, M. V. et al. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do Sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, Mar. 2010.

CARDOSO, L. R. Et al. Variabilidade genética de acessos de aguapé coletados no Estado de São Paulo. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 20, p. 1-5, 2002.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15. 1990.

FONTANA, J. D. et al. Amazon: fauna, flora, and potential (bio)processing applications. **Economic Botany**, v. 54, n. 4 (October/December 2000), p. 543-50, 2000.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220p.

GOMES JUNIOR, J. C. Contribuição ao estudo das bignoniaceae brasileiras. **V. Duzenia**, v. 2, n. 5, p. 315-316, 1951.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ DE LEON, D. **Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. 2.ed. Mexico: CIMMYT, 1994. 51p.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Société Vaudoise des Sciences Naturelles Bulletin**, Lausanne, v. 3, n. 7, p.547-579, 1976.

KUBITZKI, K.; ZIBURSKI, A. Seed dispersal in floodplain forest of Amazonia. **Biotropica**, v. 26, n. 1, p. 30-43, 1994.

LEHMENSIEK, A, et al. Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.797-803, 2001.

LOBO, P.C.; MARQUES, M.C.M.; LIEBERG, S.; JOLY, C.A. “Projeto Jacaré-Pepira. III. Aspectos sobre a germinação e o estabelecimento de plantas de três espécies ocorrentes na Bacia do rio Jacaré-Pepira, Brotas,SP”. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46., 1995, Ribeirão Preto. **Resumos**. Ribeirão Preto: FFCLRP / Universidade de São Paulo, 1995. p.320.

- LOPES, R. et al. Marcadores moleculares dominantes (Rapid e AFLP). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/marcadores.pdf>>. Acesso em: 08/07/2007.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annu Rev Ecol Syst.**, v. 15, p. 65-95, 1984.
- MARQUES, E.K. **Diagnóstico genético molecular**. Canoas, ULBRA, 2003. 372p.
- MILLER, M.P. **TTPGA - Tools for populations genetics analysis: Windows Program for the analysis of allozyme and molecular genetic data**. 1997.
- MOBOT - Missouri Botanical Garden. **Key to the Species of *Arrabidaea***. Disponível em: <http://www.mobot.org/mobot/research/ven-guayana/bignoniaceae/arrabida.html>. Consultado em: 12/06/2006.
- MORTON, N. E. ; KRIEGER, H. ; MI, M. P. Natural selection of polymorphism in Northeast Brazil. **Am. J. Hum. Genet.** 28: 153-172. 1966.
- MUHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 57, n. 2, June 2000.
- MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, v.14, n.10, p.389-394, 1999.
- OLIVEIRA, A. C.; PIEDADE, M. T. F. Implicações ecológicas da fenologia reprodutiva de *Salix martiniana* Leyb. (Salicaceae) em áreas de várzea da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 32, n. 3, p. 377-385, 2002.
- OLIVEIRA, P. R. D. et al. Análise da diversidade genética por aflu e identificação de Marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 3, p. 454-457, 2005.
- PAVLICEK, A. ; HRDÁ, S. e FLEGR, J. (1999). Free Tree - Freeware program for construction of phylogenetic tree on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. **Folia Biol.**, (Prague) v. 45, p. 97-99, 1999.
- PEREIRA, A. V. et al. Diversidade genética entre acessos de capim-elefante obtida com marcadores moleculares. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 37, n. 7, 2008.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: Solução para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 9, 1999.
- ROCHA, A. P. da et al. Polimorfismos no Carcinoma Medular de Tireóide. **Arq Bras Endocrinol Metab.** n. 51, v. 5, p. 723-730, 2007.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York: Exeter software, 2000. 236 p.

RUTLEDGE, J. et al. RAPD analysis of genetic variation among propanil-resistant and susceptible *Echinochloa crus-galli* populations in Arkansas. **Weed Science**, Lawrence, v. 48, n. 6, p. 669-674, 2000.

SALLA, M. F. S. et al. . Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, Apr. 2002.

SAMPAIO, A. J. Novas espécies de bignoniaceas. **Ann. Acad. Bras. Sci.** n. 7, v. 2, p. 111-127, 1935.

SANTOS, R. P. et al. RAPD em Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): adaptação do método para coleta de amostras *in situ*, ajuste das condições de PCR e apresentação de um processo para selecionar bandas reprodutíveis. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 37, n. 2, June 2007.

SOKAL, R.R; MICHENER, C.D. **A statistical method for evaluating systematics relationships**, University of Kansas Sci. Bull. cap. 28, p. 1409-1438, 1958.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Ed. Helianthus, 2000. 320 p. il.

_____. et al. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros.** 2ª. Ed. Manaus: INPA, 2007. 97 p. il.

VAN DER VOORT, J.N.A.M., et al. Linkage analysis by genotyping of sibling populations: a genetic map for the potato cyst nematode constructed using a “pseudo-F2” mapping strategy. **Molecular and General Genetics**, v.261, n.6, p.1021-1031, 1999.

VASCONCELOS, M. J. V. et al. Variabilidade genética em biótipos de leiteiro de Londrina/PR. **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, p. 285-291, 2000.

VIDAL, R. A. et al. Similaridade genética entre acessos de *Bidens pilosa* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. **Planta daninha**, Viçosa, v. 23, n. 3, Sept. 2005.

VOS, P., et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WINKLER, L. et al. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, n. 9, p. 1067-1072, 2003.

ZHU Y. et al. High genetic differentiation and low genetic diversity in *Incarvillea younghusbandii*, an endemic plant of Qinghai-Tibetan Plateau, revealed by AFLP markers. **Bioch. Syst. Ecol.**, v. 37, n. 5, November, p.589-596, 2009.

CAPÍTULO 3

ALCERITO T. et al. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 30, p. 677-683. 2002.

ANGARITA, A. S. R. **Inducción de resistencia en plantas. Interacción: planta-patógeno**. San José, C.R.: IICA. 2010. 261 p. il.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmacia, Supl.** v. 2, n. 2, p. 5-8. 2005.

ARNASAN, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. (ACS Symposium Series, 387).

BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: Avaliação *in vitro*. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 31, n. 3, 2006.

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncun* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatol. Bras.**, v.22, p.441-443, 1997.

BEZERRA et al. Efeito *in vitro* de extratos vegetais no crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*. In: **Fitopatol. Bras.**, v. 32, supl. (Resumos do XI Congresso Brasileiro de Fitopatologia). Brasília: SBF, 2007. 367 p. p. 131.

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptos citriodora*. **Fitopatol. Bras.**, v. 29, n. 2, p. 128-134. 2004.

CELOTO, M. I. B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 1-5. 2008.

CUNICO, M.M. et al. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart.ex Reiss., Celastraceae. **Rev.Bras. Farmacogn.**, v.12, n.2, p.69-73, 2002.

DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, I. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 590-594, 2007.

FONTANA, J. D. et al. Amazon: fauna, flora, and potential (bio)processing applications. **Economic Botany**, v. 54, n. 4 (October/December 2000) p. 543-50. 2000.

FRANZENER, G. et al. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, v. 25, p.503-507. 2003.

GONZÁLEZ, B. et al. Chemical composition and biological activity of extracts from *Arrabidaea Bilabiata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 4, p. 287-290. 2000.

GRAINGE, M.; AHMED, S. **Handbook of plants with pest control properties**. New York: John Wiley, 1988. 470p.

ITAKO, A. T. et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Trop. plant pathol.**, Brasília, v. 33, n. 3, June 2008.

KAGALE, S. et al. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 91-100. August 2004.

KLEIN, R. M. Meliáceas. In: REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense: as plantas meliáceas**. Itajaí, 1984. v.1, p. 40-46.

KREBS H. C.; KEMMERLING W.; HABERMEHL G. Qualitative and quantitative determination of fluoroacetic acid in *Arrabidaea bilabiata* and *Palicourea marcgravi* by F-19-NMR Spectroscopy. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 909-913. 1994.

LIMA, J.M. et al. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, v.27, n.1, 2009.

LO, S.C et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, n.1, p.21-31, 1996.

MAGRO, A. et al. Efficacy of plants extracts against stored products fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, p. 176-178. 2006.

OBLEDO-VÁSQUEZ, E. N.; FLORES-VERDUZCO, N. e CERVANTES-MARTÍNEZ, J. Detección del efecto de un extracto vegetal antimicrobiano sobre plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. *azul*) cultivadas *in vitro* utilizando fluorescencia inducida por laser (LIF). **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 22, n. 3, p. 328-332. 2004.

MEIJA, M. C. B.; TOLEDO, I. E. E. RAMIREZ, D. M. G. Fluoracetato de sodio estado del arte. **RETEL: Revista de Toxicología en Línea**, v. 16, p. 1-15. 2008.

RANGANATHAN, S.; BALAJEE, S. A. M. Anti-*Cryptococcus* activity of combination of extracts of *Cassia alata* and *Ocimum sanctum*. **Mycoses**, v. 43, n. 7/8, p. 299-301. 2000.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 4, p. 1267-1271. 1999. Supl.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, p. 38-42, 2001.

RODRIGUES, E. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 33, n. 2, June 2007.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v.27, n.3.2009.

RODRIGUEZ J. de et al. Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**. v. 21, p. 81-87. 2005.

SCHWARZ, A. et al. Identificação de princípios ativos presentes na *Ipomoea carnea* brasileira. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40, n. 2, p. 181-187. 2004.

SILVA, M. B. et al. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig/CTZM, p. 221-246. 2005.

SILVA, A. M. et al. Efeito de extratos vegetais no crescimento e esporulação de *Corynespora cassiicola* "in vitro". In: **Fitopatol. Bras.**, v. 32, supl. (Resumos do XI Congresso Brasileiro de Fitopatologia). Brasília: SBF, 2007. 367 p. p. 131.

SILVA, J. A. da et al. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em sementes de caupi. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 611-616. 2009.

SINGH I.; SINGH V. P.. Antifungal properties of aqueous and organic solution extracts of seed plants against *Aspergillus flavus* and *A. niger*. **Phytomorphology**, v. 50, n. 2, p. 151-157. 2000.

SOMCHIT, M. N.; REEZAL, I.; NUR, I. E.; MUTALIB, A. R. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 84, p. 1-4, 2003.

SOUZA FILHO, A.P.S.; ALVES, S.M.. Potencial alelopático de plantas de acapu (Vouacapoua americana): efeitos sobre plantas daninhas de pastagens. **Planta Daninha**, v.18, n.3, 2000.

STADNIK, J. M.; TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC. 2004. 293p. il.

TAVARES, M. A. G. C. **Busca de compostos em *Chenopodium* spp. (Chenopodiaceae) com bioatividade em relação a pragas de grãos armazenados**. 2006. 98p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TEQUIDA-MENESES, M. et al. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium poae*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.19, p.84-88, 2002.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA. 1979. 95 p. il.

_____; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40., n. 12, p. 1635-1660. 2002.

_____ et al. Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos comparados da intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em búfalos e bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 2, p. 74-79. 2004.

_____. et al. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. 2ª. Ed. Manaus: INPA, 2007. 97 p. il.

ZORN, B. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**. v. 56, p. 831-835. 2001.

ANEXOS

Universidade Federal do Amazonas UFAM
Herbário da Universidade do Amazonas-HUAM
Flora do Brasil, Região Norte

Amazonas

Herb n° 7984

BIGNONIACEAE

Arrabidaea bilabiata (Sprague) Sandwith

Det.:

Ramal AZ 2, km 5, margem direita, área adjacente a um igarapé, várzea, solo argiloso. Autazes, AM, Brasil. Lat. 03° 41' 34,8" e long. 59° 07' 24,7"

Arbusto escandente com hábito trepador, folhas jovens cor-de-vinho e adultas verdes. Flores com cálice creme-esverdeado, corola branca externamente, amarela-clara internamente. Projeto de tese de doutorado de Luciana Souza "Variabilidade Genética e extratos de *Arrabidaea bilabiata* no controle de fungos". "CHIBATA, JURARÁ-BUCHA"

Matriz de similaridade

	AUT1	AUT2	AUT3	AUT4	AUT5	AUT6	AUT7	AUT8	AUT9
AUT1		0,67	0,60	0,52	0,55	0,54	0,39	0,47	0,50
AUT2	0,67		0,68	0,58	0,61	0,60	0,45	0,53	0,54
AUT3	0,60	0,68		0,67	0,75	0,71	0,53	0,69	0,64
AUT4	0,52	0,58	0,67		0,65	0,65	0,51	0,60	0,56
AUT5	0,55	0,61	0,75	0,65		0,80	0,58	0,73	0,63
AUT6	0,54	0,60	0,71	0,65	0,80		0,60	0,72	0,68
AUT7	0,39	0,45	0,53	0,51	0,58	0,60		0,65	0,60
AUT8	0,47	0,53	0,69	0,60	0,73	0,72	0,65		0,70
AUT9	0,50	0,54	0,64	0,56	0,63	0,68	0,60	0,70	
AUT10	0,46	0,49	0,64	0,55	0,68	0,64	0,57	0,73	0,63
AUT11	0,51	0,54	0,67	0,57	0,68	0,68	0,53	0,76	0,79
AUT12	0,52	0,58	0,61	0,51	0,60	0,63	0,54	0,62	0,67
AUT13	0,52	0,56	0,64	0,57	0,72	0,69	0,62	0,71	0,69
AUT14	0,47	0,52	0,63	0,54	0,65	0,64	0,54	0,68	0,60
AUT15	0,49	0,52	0,65	0,57	0,66	0,63	0,50	0,67	0,69
AUT16	0,46	0,48	0,65	0,57	0,71	0,62	0,50	0,62	0,62
AUT17	0,35	0,41	0,47	0,45	0,49	0,49	0,45	0,50	0,49
AUT18	0,33	0,36	0,48	0,41	0,50	0,46	0,41	0,50	0,49
AUT19	0,30	0,34	0,45	0,41	0,51	0,49	0,37	0,48	0,48
AUT20	0,37	0,39	0,36	0,35	0,39	0,41	0,36	0,41	0,42
AUT21	0,31	0,32	0,35	0,35	0,36	0,37	0,29	0,36	0,40
AUT22	0,32	0,35	0,41	0,39	0,43	0,41	0,34	0,45	0,42
PAR1	0,22	0,24	0,27	0,24	0,28	0,27	0,24	0,29	0,22
PAR2	0,20	0,21	0,24	0,23	0,25	0,27	0,23	0,28	0,25
PAR3	0,22	0,24	0,25	0,26	0,24	0,26	0,23	0,27	0,24
PAR4	0,19	0,21	0,24	0,24	0,26	0,27	0,20	0,27	0,23
PAR5	0,21	0,20	0,24	0,21	0,23	0,26	0,22	0,26	0,23
PAR6	0,21	0,23	0,28	0,24	0,26	0,28	0,22	0,28	0,23
PAR7	0,21	0,21	0,24	0,22	0,23	0,25	0,20	0,24	0,21
PAR8	0,20	0,19	0,22	0,21	0,22	0,22	0,19	0,23	0,20
PAR9	0,16	0,16	0,19	0,18	0,18	0,21	0,17	0,22	0,19
PAR10	0,18	0,18	0,26	0,23	0,27	0,26	0,21	0,29	0,25
PAR11	0,22	0,22	0,30	0,26	0,29	0,31	0,26	0,30	0,30
PAR12	0,24	0,22	0,29	0,27	0,30	0,32	0,26	0,30	0,31
PAR13	0,24	0,23	0,30	0,29	0,32	0,33	0,27	0,30	0,31
PAR14	0,23	0,23	0,29	0,27	0,31	0,32	0,25	0,30	0,28
PAR15	0,22	0,22	0,31	0,26	0,32	0,32	0,25	0,31	0,28
PAR16	0,22	0,21	0,27	0,25	0,31	0,31	0,26	0,30	0,26
PAR17	0,20	0,20	0,27	0,23	0,30	0,28	0,27	0,32	0,25
PAR18	0,23	0,22	0,31	0,25	0,33	0,33	0,30	0,34	0,31
PAR19	0,20	0,22	0,27	0,22	0,29	0,27	0,21	0,29	0,23
PAR20	0,22	0,22	0,30	0,24	0,31	0,32	0,29	0,32	0,29
PAR215	0,20	0,24	0,25	0,19	0,26	0,28	0,23	0,27	0,24
PAR22	0,20	0,21	0,29	0,23	0,31	0,32	0,29	0,32	0,29

ITA1	0,19	0,18	0,29	0,25	0,29	0,29	0,27	0,31	0,28
ITA2	0,21	0,21	0,28	0,25	0,30	0,30	0,28	0,34	0,29
ITA3	0,23	0,23	0,31	0,27	0,34	0,33	0,29	0,37	0,32
ITA4	0,22	0,22	0,31	0,26	0,34	0,32	0,30	0,37	0,31
ITA5	0,22	0,23	0,31	0,27	0,34	0,33	0,32	0,37	0,32
ITA6	0,21	0,23	0,32	0,27	0,33	0,35	0,31	0,37	0,31
ITA7	0,20	0,21	0,30	0,25	0,33	0,31	0,28	0,35	0,32
ITA8	0,18	0,18	0,26	0,22	0,27	0,28	0,27	0,31	0,26
ITA9	0,19	0,19	0,30	0,25	0,30	0,32	0,26	0,35	0,28
ITA10	0,21	0,22	0,30	0,26	0,34	0,33	0,29	0,36	0,27
ITA11	0,24	0,24	0,34	0,31	0,37	0,37	0,34	0,42	0,35
ITA12	0,19	0,19	0,29	0,27	0,31	0,28	0,29	0,32	0,28
ITA13	0,16	0,17	0,27	0,27	0,32	0,28	0,29	0,31	0,26
ITA14	0,20	0,21	0,29	0,25	0,33	0,31	0,26	0,35	0,30
ITA15	0,22	0,23	0,30	0,26	0,34	0,33	0,26	0,34	0,31
ITA16	0,19	0,21	0,29	0,25	0,32	0,32	0,27	0,31	0,30
ITA17	0,19	0,21	0,31	0,27	0,32	0,33	0,28	0,34	0,30
ITA18	0,20	0,23	0,31	0,27	0,31	0,32	0,28	0,32	0,30
ITA19	0,22	0,23	0,30	0,26	0,31	0,32	0,27	0,32	0,30
ITA20	0,14	0,15	0,24	0,22	0,28	0,28	0,22	0,28	0,26
ITA21	0,17	0,18	0,26	0,23	0,29	0,30	0,23	0,29	0,27
	0,80	0,14	0,51						

AUT10	AUT11	AUT12	AUT13	AUT14	AUT15	AUT16	AUT17	AUT18	AUT19
0,46	0,51	0,52	0,52	0,47	0,49	0,46	0,35	0,33	0,30
0,49	0,54	0,58	0,56	0,52	0,52	0,48	0,41	0,36	0,34
0,64	0,67	0,61	0,64	0,63	0,65	0,65	0,47	0,48	0,45
0,55	0,57	0,51	0,57	0,54	0,57	0,57	0,45	0,41	0,41
0,68	0,68	0,60	0,72	0,65	0,66	0,71	0,49	0,50	0,51
0,64	0,68	0,63	0,69	0,64	0,63	0,62	0,49	0,46	0,49
0,57	0,53	0,54	0,62	0,54	0,50	0,50	0,45	0,41	0,37
0,73	0,76	0,62	0,71	0,68	0,67	0,62	0,50	0,50	0,48
0,63	0,79	0,67	0,69	0,60	0,69	0,62	0,49	0,49	0,48
	0,67	0,63	0,67	0,64	0,61	0,59	0,51	0,49	0,48
0,67		0,70	0,67	0,63	0,66	0,63	0,48	0,51	0,49
0,63	0,70		0,69	0,59	0,60	0,56	0,53	0,48	0,48
0,67	0,67	0,69		0,70	0,74	0,66	0,54	0,55	0,51
0,64	0,63	0,59	0,70		0,74	0,57	0,55	0,51	0,49
0,61	0,66	0,60	0,74	0,74		0,66	0,53	0,56	0,55
0,59	0,63	0,56	0,66	0,57	0,66		0,51	0,54	0,57
0,51	0,48	0,53	0,54	0,55	0,53	0,51		0,69	0,60
0,49	0,51	0,48	0,55	0,51	0,56	0,54	0,69		0,66
0,48	0,49	0,48	0,51	0,49	0,55	0,57	0,60	0,66	
0,40	0,43	0,40	0,42	0,40	0,40	0,36	0,46	0,44	0,44
0,39	0,41	0,42	0,36	0,36	0,44	0,44	0,45	0,47	0,60
0,41	0,45	0,44	0,41	0,42	0,46	0,48	0,51	0,50	0,56
0,25	0,25	0,26	0,28	0,28	0,27	0,27	0,29	0,27	0,28
0,26	0,27	0,26	0,26	0,26	0,25	0,25	0,26	0,24	0,26
0,24	0,25	0,25	0,25	0,27	0,25	0,23	0,26	0,24	0,24
0,23	0,25	0,24	0,25	0,26	0,25	0,25	0,25	0,23	0,25
0,23	0,26	0,24	0,24	0,26	0,23	0,20	0,25	0,24	0,24
0,25	0,27	0,27	0,25	0,29	0,26	0,23	0,28	0,27	0,30
0,22	0,22	0,23	0,22	0,27	0,24	0,22	0,28	0,26	0,26
0,20	0,22	0,19	0,21	0,24	0,23	0,22	0,24	0,24	0,25
0,21	0,19	0,20	0,19	0,23	0,22	0,19	0,22	0,24	0,24
0,25	0,28	0,24	0,25	0,29	0,27	0,28	0,31	0,33	0,34
0,28	0,30	0,28	0,30	0,29	0,31	0,33	0,27	0,33	0,35
0,30	0,30	0,29	0,31	0,30	0,31	0,35	0,30	0,34	0,37
0,31	0,31	0,29	0,32	0,30	0,31	0,36	0,31	0,35	0,37
0,31	0,28	0,26	0,32	0,29	0,31	0,34	0,28	0,33	0,35
0,32	0,30	0,27	0,30	0,32	0,30	0,34	0,28	0,32	0,34
0,30	0,28	0,26	0,30	0,29	0,29	0,31	0,29	0,32	0,35
0,28	0,28	0,25	0,29	0,31	0,28	0,31	0,27	0,31	0,30
0,30	0,31	0,28	0,33	0,33	0,31	0,36	0,29	0,35	0,32
0,27	0,28	0,28	0,27	0,32	0,31	0,31	0,27	0,34	0,36
0,29	0,27	0,26	0,30	0,30	0,29	0,33	0,28	0,34	0,36
0,24	0,23	0,24	0,28	0,27	0,26	0,31	0,25	0,27	0,31
0,28	0,28	0,27	0,32	0,32	0,30	0,32	0,30	0,33	0,35

0,28	0,29	0,24	0,29	0,31	0,29	0,32	0,31	0,36	0,35
0,30	0,30	0,27	0,31	0,34	0,30	0,31	0,32	0,36	0,35
0,30	0,33	0,29	0,33	0,34	0,32	0,37	0,32	0,39	0,39
0,33	0,32	0,28	0,33	0,37	0,32	0,32	0,32	0,37	0,35
0,34	0,32	0,30	0,34	0,37	0,32	0,34	0,36	0,38	0,37
0,33	0,32	0,27	0,32	0,37	0,30	0,33	0,30	0,33	0,35
0,33	0,31	0,27	0,34	0,35	0,33	0,33	0,37	0,40	0,37
0,27	0,26	0,23	0,27	0,33	0,27	0,25	0,29	0,31	0,31
0,31	0,29	0,24	0,29	0,36	0,31	0,28	0,29	0,31	0,33
0,29	0,29	0,25	0,30	0,35	0,33	0,34	0,30	0,33	0,36
0,36	0,36	0,30	0,34	0,37	0,38	0,35	0,36	0,38	0,39
0,28	0,26	0,21	0,29	0,33	0,31	0,30	0,27	0,29	0,28
0,27	0,28	0,21	0,26	0,30	0,29	0,29	0,28	0,29	0,29
0,31	0,31	0,28	0,30	0,30	0,31	0,34	0,30	0,33	0,37
0,30	0,29	0,28	0,32	0,33	0,32	0,36	0,32	0,35	0,38
0,27	0,28	0,27	0,29	0,30	0,31	0,34	0,30	0,35	0,38
0,31	0,29	0,28	0,29	0,30	0,30	0,36	0,33	0,38	0,42
0,30	0,29	0,27	0,28	0,32	0,30	0,35	0,33	0,37	0,38
0,29	0,29	0,28	0,29	0,31	0,29	0,35	0,30	0,34	0,37
0,26	0,24	0,22	0,27	0,27	0,30	0,31	0,28	0,33	0,37
0,27	0,25	0,24	0,28	0,30	0,31	0,32	0,28	0,34	0,38

AUT20	AUT21	AUT22	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4	PAR5	PAR6	PAR7
0,37	0,31	0,32	0,22	0,20	0,22	0,19	0,21	0,21	0,21
0,39	0,32	0,35	0,24	0,21	0,24	0,21	0,20	0,23	0,21
0,36	0,35	0,41	0,27	0,24	0,25	0,24	0,24	0,28	0,24
0,35	0,35	0,39	0,24	0,23	0,26	0,24	0,21	0,24	0,22
0,39	0,36	0,43	0,28	0,25	0,24	0,26	0,23	0,26	0,23
0,41	0,37	0,41	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26	0,28	0,25
0,36	0,29	0,34	0,24	0,23	0,23	0,20	0,22	0,22	0,20
0,41	0,36	0,45	0,29	0,28	0,27	0,27	0,26	0,28	0,24
0,42	0,40	0,42	0,22	0,25	0,24	0,23	0,23	0,23	0,21
0,40	0,39	0,41	0,25	0,26	0,24	0,23	0,23	0,25	0,22
0,43	0,41	0,45	0,25	0,27	0,25	0,25	0,26	0,27	0,22
0,40	0,42	0,44	0,26	0,26	0,25	0,24	0,24	0,27	0,23
0,42	0,36	0,41	0,28	0,26	0,25	0,25	0,24	0,25	0,22
0,40	0,36	0,42	0,28	0,26	0,27	0,26	0,26	0,29	0,27
0,40	0,44	0,46	0,27	0,25	0,25	0,25	0,23	0,26	0,24
0,36	0,44	0,48	0,27	0,25	0,23	0,25	0,20	0,23	0,22
0,46	0,45	0,51	0,29	0,26	0,26	0,25	0,25	0,28	0,28
0,44	0,47	0,50	0,27	0,24	0,24	0,23	0,24	0,27	0,26
0,44	0,60	0,56	0,28	0,26	0,24	0,25	0,24	0,30	0,26
	0,50	0,51	0,22	0,18	0,21	0,17	0,17	0,22	0,22
0,50		0,69	0,25	0,25	0,24	0,24	0,19	0,27	0,26
0,51	0,69		0,31	0,29	0,26	0,26	0,22	0,28	0,28
0,22	0,25	0,31		0,63	0,64	0,65	0,60	0,57	0,56
0,18	0,25	0,29	0,63		0,66	0,66	0,73	0,65	0,59
0,21	0,24	0,26	0,64	0,66		0,64	0,60	0,61	0,67
0,17	0,24	0,26	0,65	0,66	0,64		0,62	0,63	0,56
0,17	0,19	0,22	0,60	0,73	0,60	0,62		0,66	0,62
0,22	0,27	0,28	0,57	0,65	0,61	0,63	0,66		0,74
0,22	0,26	0,28	0,56	0,59	0,67	0,56	0,62	0,74	
0,18	0,23	0,27	0,57	0,56	0,58	0,59	0,58	0,65	0,73
0,17	0,21	0,25	0,55	0,55	0,60	0,55	0,61	0,63	0,74
0,23	0,26	0,29	0,50	0,53	0,48	0,55	0,55	0,61	0,55
0,20	0,28	0,28	0,45	0,46	0,40	0,46	0,48	0,52	0,48
0,22	0,30	0,31	0,45	0,45	0,40	0,46	0,45	0,49	0,47
0,23	0,31	0,33	0,44	0,44	0,40	0,46	0,44	0,48	0,45
0,23	0,30	0,31	0,44	0,43	0,38	0,43	0,42	0,47	0,44
0,22	0,30	0,31	0,45	0,44	0,41	0,44	0,45	0,46	0,44
0,23	0,30	0,31	0,44	0,44	0,41	0,42	0,44	0,45	0,46
0,21	0,26	0,29	0,47	0,42	0,40	0,46	0,45	0,47	0,44
0,21	0,25	0,27	0,44	0,39	0,37	0,40	0,42	0,41	0,40
0,21	0,32	0,32	0,47	0,42	0,37	0,44	0,43	0,45	0,39
0,22	0,27	0,28	0,38	0,40	0,36	0,40	0,40	0,43	0,40
0,21	0,27	0,27	0,41	0,41	0,34	0,40	0,39	0,43	0,40
0,17	0,26	0,27	0,39	0,40	0,35	0,41	0,41	0,44	0,40

0,20	0,27	0,29	0,42	0,38	0,37	0,38	0,41	0,40	0,40
0,23	0,28	0,29	0,42	0,39	0,40	0,39	0,43	0,44	0,44
0,25	0,28	0,30	0,40	0,36	0,34	0,36	0,40	0,40	0,38
0,25	0,26	0,32	0,47	0,43	0,39	0,40	0,42	0,45	0,44
0,23	0,28	0,30	0,42	0,39	0,38	0,40	0,40	0,43	0,42
0,24	0,24	0,29	0,45	0,40	0,38	0,41	0,40	0,41	0,39
0,23	0,30	0,30	0,41	0,37	0,35	0,40	0,39	0,44	0,40
0,22	0,21	0,23	0,40	0,38	0,35	0,38	0,43	0,40	0,38
0,20	0,22	0,26	0,42	0,41	0,35	0,40	0,41	0,41	0,38
0,23	0,31	0,32	0,43	0,37	0,36	0,40	0,39	0,38	0,35
0,25	0,29	0,33	0,43	0,40	0,38	0,39	0,42	0,43	0,41
0,16	0,17	0,21	0,35	0,30	0,26	0,29	0,32	0,29	0,26
0,20	0,21	0,24	0,36	0,32	0,31	0,35	0,34	0,32	0,29
0,23	0,29	0,30	0,42	0,41	0,38	0,40	0,40	0,42	0,39
0,23	0,31	0,33	0,44	0,45	0,37	0,45	0,46	0,46	0,41
0,20	0,31	0,30	0,38	0,39	0,35	0,39	0,41	0,42	0,38
0,22	0,34	0,32	0,39	0,41	0,34	0,38	0,41	0,44	0,38
0,22	0,30	0,30	0,40	0,42	0,38	0,42	0,42	0,46	0,41
0,22	0,31	0,30	0,41	0,43	0,37	0,42	0,44	0,45	0,40
0,18	0,28	0,29	0,36	0,39	0,29	0,39	0,39	0,39	0,36
0,19	0,29	0,29	0,42	0,43	0,36	0,40	0,43	0,44	0,38

PAR8	PAR9	PAR10	PAR11	PAR12	PAR13	PAR14	PAR15	PAR16	PAR17
0,20	0,16	0,18	0,22	0,24	0,24	0,23	0,22	0,22	0,20
0,19	0,16	0,18	0,22	0,22	0,23	0,23	0,22	0,21	0,20
0,22	0,19	0,26	0,30	0,29	0,30	0,29	0,31	0,27	0,27
0,21	0,18	0,23	0,26	0,27	0,29	0,27	0,26	0,25	0,23
0,22	0,18	0,27	0,29	0,30	0,32	0,31	0,32	0,31	0,30
0,22	0,21	0,26	0,31	0,32	0,33	0,32	0,32	0,31	0,28
0,19	0,17	0,21	0,26	0,26	0,27	0,25	0,25	0,26	0,27
0,23	0,22	0,29	0,30	0,30	0,30	0,30	0,31	0,30	0,32
0,20	0,19	0,25	0,30	0,31	0,31	0,28	0,28	0,26	0,25
0,20	0,21	0,25	0,28	0,30	0,31	0,31	0,32	0,30	0,28
0,22	0,19	0,28	0,30	0,30	0,31	0,28	0,30	0,28	0,28
0,19	0,20	0,24	0,28	0,29	0,29	0,26	0,27	0,26	0,25
0,21	0,19	0,25	0,30	0,31	0,32	0,32	0,30	0,30	0,29
0,24	0,23	0,29	0,29	0,30	0,30	0,29	0,32	0,29	0,31
0,23	0,22	0,27	0,31	0,31	0,31	0,31	0,30	0,29	0,28
0,22	0,19	0,28	0,33	0,35	0,36	0,34	0,34	0,31	0,31
0,24	0,22	0,31	0,27	0,30	0,31	0,28	0,28	0,29	0,27
0,24	0,24	0,33	0,33	0,34	0,35	0,33	0,32	0,32	0,31
0,25	0,24	0,34	0,35	0,37	0,37	0,35	0,34	0,35	0,30
0,18	0,17	0,23	0,20	0,22	0,23	0,23	0,22	0,23	0,21
0,23	0,21	0,26	0,28	0,30	0,31	0,30	0,30	0,30	0,26
0,27	0,25	0,29	0,28	0,31	0,33	0,31	0,31	0,31	0,29
0,57	0,55	0,50	0,45	0,45	0,44	0,44	0,45	0,44	0,47
0,56	0,55	0,53	0,46	0,45	0,44	0,43	0,44	0,44	0,42
0,58	0,60	0,48	0,40	0,40	0,40	0,38	0,41	0,41	0,40
0,59	0,55	0,55	0,46	0,46	0,46	0,43	0,44	0,42	0,46
0,58	0,61	0,55	0,48	0,45	0,44	0,42	0,45	0,44	0,45
0,65	0,63	0,61	0,52	0,49	0,48	0,47	0,46	0,45	0,47
0,73	0,74	0,55	0,48	0,47	0,45	0,44	0,44	0,46	0,44
	0,75	0,55	0,47	0,47	0,44	0,42	0,43	0,41	0,42
0,75		0,57	0,45	0,43	0,42	0,41	0,44	0,42	0,42
0,55	0,57		0,63	0,60	0,57	0,54	0,60	0,56	0,60
0,47	0,45	0,63		0,89	0,78	0,72	0,68	0,68	0,67
0,47	0,43	0,60	0,89		0,85	0,77	0,70	0,71	0,66
0,44	0,42	0,57	0,78	0,85		0,83	0,72	0,71	0,63
0,42	0,41	0,54	0,72	0,77	0,83		0,85	0,84	0,72
0,43	0,44	0,60	0,68	0,70	0,72	0,85		0,85	0,81
0,41	0,42	0,56	0,68	0,71	0,71	0,84	0,85		0,73
0,42	0,42	0,60	0,67	0,66	0,63	0,72	0,81	0,73	
0,40	0,38	0,52	0,62	0,64	0,57	0,64	0,69	0,68	0,75
0,38	0,39	0,47	0,48	0,49	0,49	0,50	0,49	0,48	0,53
0,40	0,41	0,47	0,57	0,60	0,59	0,67	0,67	0,67	0,63
0,39	0,39	0,46	0,53	0,55	0,50	0,61	0,62	0,60	0,61
0,38	0,37	0,49	0,60	0,62	0,57	0,65	0,66	0,65	0,65

0,38	0,38	0,50	0,53	0,53	0,51	0,53	0,56	0,53	0,60
0,43	0,42	0,53	0,57	0,57	0,52	0,54	0,57	0,57	0,59
0,38	0,39	0,47	0,50	0,50	0,49	0,51	0,55	0,50	0,57
0,43	0,45	0,52	0,53	0,54	0,52	0,52	0,57	0,53	0,59
0,40	0,39	0,49	0,51	0,52	0,50	0,50	0,53	0,49	0,58
0,38	0,39	0,46	0,49	0,48	0,46	0,44	0,49	0,47	0,52
0,38	0,41	0,51	0,50	0,49	0,48	0,50	0,56	0,50	0,57
0,36	0,41	0,49	0,44	0,43	0,41	0,42	0,47	0,43	0,49
0,38	0,40	0,46	0,45	0,42	0,40	0,43	0,47	0,42	0,48
0,35	0,36	0,43	0,43	0,42	0,42	0,45	0,48	0,47	0,53
0,36	0,42	0,47	0,47	0,46	0,45	0,46	0,50	0,49	0,49
0,28	0,27	0,38	0,38	0,37	0,37	0,37	0,40	0,36	0,44
0,29	0,32	0,38	0,39	0,39	0,39	0,40	0,45	0,41	0,42
0,36	0,39	0,48	0,51	0,53	0,53	0,52	0,56	0,52	0,53
0,41	0,43	0,51	0,56	0,58	0,53	0,56	0,59	0,54	0,57
0,36	0,38	0,48	0,53	0,56	0,53	0,55	0,57	0,57	0,53
0,37	0,39	0,48	0,56	0,56	0,59	0,58	0,57	0,57	0,53
0,39	0,40	0,50	0,59	0,61	0,59	0,60	0,58	0,57	0,57
0,39	0,42	0,48	0,54	0,56	0,53	0,55	0,54	0,54	0,53
0,35	0,36	0,48	0,52	0,54	0,52	0,54	0,50	0,49	0,51
0,41	0,40	0,49	0,56	0,57	0,54	0,54	0,50	0,50	0,48

PAR18	PAR19	PAR20	PAR21	PAR22	ITA1	ITA2	ITA3	ITA4	ITA5
0,23	0,20	0,22	0,20	0,20	0,19	0,21	0,23	0,22	0,22
0,22	0,22	0,22	0,24	0,21	0,18	0,21	0,23	0,22	0,23
0,31	0,27	0,30	0,25	0,29	0,29	0,28	0,31	0,31	0,31
0,25	0,22	0,24	0,19	0,23	0,25	0,25	0,27	0,26	0,27
0,33	0,29	0,31	0,26	0,31	0,29	0,30	0,34	0,34	0,34
0,33	0,27	0,32	0,28	0,32	0,29	0,30	0,33	0,32	0,33
0,30	0,21	0,29	0,23	0,29	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32
0,34	0,29	0,32	0,27	0,32	0,31	0,34	0,37	0,37	0,37
0,31	0,23	0,29	0,24	0,29	0,28	0,29	0,32	0,31	0,32
0,30	0,27	0,29	0,24	0,28	0,28	0,30	0,30	0,33	0,34
0,31	0,28	0,27	0,23	0,28	0,29	0,30	0,33	0,32	0,32
0,28	0,28	0,26	0,24	0,27	0,24	0,27	0,29	0,28	0,30
0,33	0,27	0,30	0,28	0,32	0,29	0,31	0,33	0,33	0,34
0,33	0,32	0,30	0,27	0,32	0,31	0,34	0,34	0,37	0,37
0,31	0,31	0,29	0,26	0,30	0,29	0,30	0,32	0,32	0,32
0,36	0,31	0,33	0,31	0,32	0,32	0,31	0,37	0,32	0,34
0,29	0,27	0,28	0,25	0,30	0,31	0,32	0,32	0,32	0,36
0,35	0,34	0,34	0,27	0,33	0,36	0,36	0,39	0,37	0,38
0,32	0,36	0,36	0,31	0,35	0,35	0,35	0,39	0,35	0,37
0,21	0,21	0,22	0,21	0,17	0,20	0,23	0,25	0,25	0,23
0,25	0,32	0,27	0,27	0,26	0,27	0,28	0,28	0,26	0,28
0,27	0,32	0,28	0,27	0,27	0,29	0,29	0,30	0,32	0,30
0,44	0,47	0,38	0,41	0,39	0,42	0,42	0,40	0,47	0,42
0,39	0,42	0,40	0,41	0,40	0,38	0,39	0,36	0,43	0,39
0,37	0,37	0,36	0,34	0,35	0,37	0,40	0,34	0,39	0,38
0,40	0,44	0,40	0,40	0,41	0,38	0,39	0,36	0,40	0,40
0,42	0,43	0,40	0,39	0,41	0,41	0,43	0,40	0,42	0,40
0,41	0,45	0,43	0,43	0,44	0,40	0,44	0,40	0,45	0,43
0,40	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40	0,44	0,38	0,44	0,42
0,40	0,38	0,40	0,39	0,38	0,38	0,43	0,38	0,43	0,40
0,38	0,39	0,41	0,39	0,37	0,38	0,42	0,39	0,45	0,39
0,52	0,47	0,47	0,46	0,49	0,50	0,53	0,47	0,52	0,49
0,62	0,48	0,57	0,53	0,60	0,53	0,57	0,50	0,53	0,51
0,64	0,49	0,60	0,55	0,62	0,53	0,57	0,50	0,54	0,52
0,57	0,49	0,59	0,50	0,57	0,51	0,52	0,49	0,52	0,50
0,64	0,50	0,67	0,61	0,65	0,53	0,54	0,51	0,52	0,50
0,69	0,49	0,67	0,62	0,66	0,56	0,57	0,55	0,57	0,53
0,68	0,48	0,67	0,60	0,65	0,53	0,57	0,50	0,53	0,49
0,75	0,53	0,63	0,61	0,65	0,60	0,59	0,57	0,59	0,58
	0,55	0,69	0,66	0,73	0,62	0,64	0,62	0,63	0,65
0,55		0,52	0,50	0,53	0,47	0,48	0,50	0,50	0,49
0,69	0,52		0,68	0,69	0,52	0,52	0,63	0,54	0,52
0,66	0,50	0,68		0,72	0,50	0,54	0,52	0,50	0,55
0,73	0,53	0,69	0,72		0,61	0,64	0,56	0,58	0,63

0,62	0,47	0,52	0,50	0,61		0,81	0,67	0,67	0,67
0,64	0,48	0,52	0,54	0,64	0,81		0,63	0,71	0,70
0,62	0,50	0,63	0,52	0,56	0,67	0,63		0,64	0,67
0,63	0,50	0,54	0,50	0,58	0,67	0,71	0,64		0,75
0,65	0,49	0,52	0,55	0,63	0,67	0,70	0,67	0,75	
0,55	0,44	0,47	0,48	0,55	0,61	0,64	0,55	0,69	0,66
0,62	0,50	0,55	0,54	0,62	0,68	0,69	0,69	0,69	0,77
0,56	0,47	0,50	0,44	0,51	0,59	0,58	0,55	0,61	0,63
0,52	0,48	0,48	0,43	0,48	0,57	0,55	0,53	0,61	0,59
0,58	0,51	0,50	0,47	0,52	0,59	0,60	0,64	0,61	0,63
0,56	0,47	0,53	0,43	0,51	0,54	0,59	0,65	0,67	0,59
0,47	0,40	0,40	0,34	0,43	0,53	0,50	0,53	0,56	0,54
0,45	0,41	0,47	0,40	0,45	0,51	0,51	0,51	0,54	0,51
0,50	0,49	0,56	0,46	0,49	0,57	0,58	0,59	0,59	0,53
0,57	0,57	0,65	0,58	0,61	0,59	0,58	0,62	0,58	0,57
0,57	0,55	0,68	0,53	0,63	0,57	0,57	0,63	0,56	0,51
0,58	0,54	0,68	0,56	0,61	0,58	0,57	0,61	0,56	0,54
0,62	0,60	0,66	0,57	0,65	0,59	0,59	0,58	0,57	0,56
0,60	0,57	0,65	0,55	0,61	0,54	0,56	0,61	0,55	0,52
0,52	0,55	0,58	0,47	0,57	0,55	0,51	0,55	0,53	0,47
0,54	0,60	0,59	0,52	0,56	0,51	0,51	0,55	0,54	0,48

ITA6	ITA7	ITA8	ITA9	ITA10	ITA11	ITA12	ITA13	ITA14	ITA15
0,21	0,20	0,18	0,19	0,21	0,24	0,19	0,16	0,20	0,22
0,23	0,21	0,18	0,19	0,22	0,24	0,19	0,17	0,21	0,23
0,32	0,30	0,26	0,30	0,30	0,34	0,29	0,27	0,29	0,30
0,27	0,25	0,22	0,25	0,26	0,31	0,27	0,27	0,25	0,26
0,33	0,33	0,27	0,30	0,34	0,37	0,31	0,32	0,33	0,34
0,35	0,31	0,28	0,32	0,33	0,37	0,28	0,28	0,31	0,33
0,31	0,28	0,27	0,26	0,29	0,34	0,29	0,29	0,26	0,26
0,37	0,35	0,31	0,35	0,36	0,42	0,32	0,31	0,35	0,34
0,31	0,32	0,26	0,28	0,27	0,35	0,28	0,26	0,30	0,31
0,33	0,33	0,27	0,31	0,29	0,36	0,28	0,27	0,31	0,30
0,32	0,31	0,26	0,29	0,29	0,36	0,26	0,28	0,31	0,29
0,27	0,27	0,23	0,24	0,25	0,30	0,21	0,21	0,28	0,28
0,32	0,34	0,27	0,29	0,30	0,34	0,29	0,26	0,30	0,32
0,37	0,35	0,33	0,36	0,35	0,37	0,33	0,30	0,30	0,33
0,30	0,33	0,27	0,31	0,33	0,38	0,31	0,29	0,31	0,32
0,33	0,33	0,25	0,28	0,34	0,35	0,30	0,29	0,34	0,36
0,30	0,37	0,29	0,29	0,30	0,36	0,27	0,28	0,30	0,32
0,33	0,40	0,31	0,31	0,33	0,38	0,29	0,29	0,33	0,35
0,35	0,37	0,31	0,33	0,36	0,39	0,28	0,29	0,37	0,38
0,24	0,23	0,22	0,20	0,23	0,25	0,16	0,20	0,23	0,23
0,24	0,30	0,21	0,22	0,31	0,29	0,17	0,21	0,29	0,31
0,29	0,30	0,23	0,26	0,32	0,33	0,21	0,24	0,30	0,33
0,45	0,41	0,40	0,42	0,43	0,43	0,35	0,36	0,42	0,44
0,40	0,37	0,38	0,41	0,37	0,40	0,30	0,32	0,41	0,45
0,38	0,35	0,35	0,35	0,36	0,38	0,26	0,31	0,38	0,37
0,41	0,40	0,38	0,40	0,40	0,39	0,29	0,35	0,40	0,45
0,40	0,39	0,43	0,41	0,39	0,42	0,32	0,34	0,40	0,46
0,41	0,44	0,40	0,41	0,38	0,43	0,29	0,32	0,42	0,46
0,39	0,40	0,38	0,38	0,35	0,41	0,26	0,29	0,39	0,41
0,38	0,38	0,36	0,38	0,35	0,36	0,28	0,29	0,36	0,41
0,39	0,41	0,41	0,40	0,36	0,42	0,27	0,32	0,39	0,43
0,46	0,51	0,49	0,46	0,43	0,47	0,38	0,38	0,48	0,51
0,49	0,50	0,44	0,45	0,43	0,47	0,38	0,39	0,51	0,56
0,48	0,49	0,43	0,42	0,42	0,46	0,37	0,39	0,53	0,58
0,46	0,48	0,41	0,40	0,42	0,45	0,37	0,39	0,53	0,53
0,44	0,50	0,42	0,43	0,45	0,46	0,37	0,40	0,52	0,56
0,49	0,56	0,47	0,47	0,48	0,50	0,40	0,45	0,56	0,59
0,47	0,50	0,43	0,42	0,47	0,49	0,36	0,41	0,52	0,54
0,52	0,57	0,49	0,48	0,53	0,49	0,44	0,42	0,53	0,57
0,55	0,62	0,56	0,52	0,58	0,56	0,47	0,45	0,50	0,57
0,44	0,50	0,47	0,48	0,51	0,47	0,40	0,41	0,49	0,57
0,47	0,55	0,50	0,48	0,50	0,53	0,40	0,47	0,56	0,65
0,48	0,54	0,44	0,43	0,47	0,43	0,34	0,40	0,46	0,58
0,55	0,62	0,51	0,48	0,52	0,51	0,43	0,45	0,49	0,61

0,61	0,68	0,59	0,57	0,59	0,54	0,53	0,51	0,57	0,59
0,64	0,69	0,58	0,55	0,60	0,59	0,50	0,51	0,58	0,58
0,55	0,69	0,55	0,53	0,64	0,65	0,53	0,51	0,59	0,62
0,69	0,69	0,61	0,61	0,61	0,67	0,56	0,54	0,59	0,58
0,66	0,77	0,63	0,59	0,63	0,59	0,54	0,51	0,53	0,57
	0,60	0,64	0,59	0,59	0,54	0,50	0,47	0,51	0,52
0,60		0,66	0,63	0,67	0,64	0,57	0,57	0,57	0,61
0,64	0,66		0,71	0,61	0,59	0,56	0,55	0,52	0,53
0,59	0,63	0,71		0,60	0,55	0,57	0,52	0,55	0,53
0,59	0,67	0,61	0,60		0,64	0,63	0,57	0,54	0,55
0,54	0,64	0,59	0,55	0,64		0,61	0,60	0,60	0,55
0,50	0,57	0,56	0,57	0,63	0,61		0,63	0,51	0,45
0,47	0,57	0,55	0,52	0,57	0,60	0,63		0,63	0,56
0,51	0,57	0,52	0,55	0,54	0,60	0,51	0,63		0,66
0,52	0,61	0,53	0,53	0,55	0,55	0,45	0,56	0,66	
0,49	0,56	0,50	0,45	0,53	0,60	0,46	0,55	0,61	0,78
0,52	0,58	0,50	0,51	0,52	0,57	0,44	0,52	0,66	0,73
0,54	0,59	0,53	0,52	0,54	0,54	0,44	0,50	0,58	0,70
0,50	0,56	0,50	0,50	0,52	0,57	0,45	0,51	0,61	0,72
0,46	0,53	0,47	0,50	0,51	0,51	0,45	0,49	0,57	0,67
0,46	0,54	0,50	0,51	0,48	0,51	0,41	0,49	0,62	0,70

ITA16	ITA17	ITA18	ITA19	ITA20	ITA21
0,19	0,19	0,20	0,22	0,14	0,17
0,21	0,21	0,23	0,23	0,15	0,18
0,29	0,31	0,31	0,30	0,24	0,26
0,25	0,27	0,27	0,26	0,22	0,23
0,32	0,32	0,31	0,31	0,28	0,29
0,32	0,33	0,32	0,32	0,28	0,30
0,27	0,28	0,28	0,27	0,22	0,23
0,31	0,34	0,32	0,32	0,28	0,29
0,30	0,30	0,30	0,30	0,26	0,27
0,27	0,31	0,30	0,29	0,26	0,27
0,28	0,29	0,29	0,29	0,24	0,25
0,27	0,28	0,27	0,28	0,22	0,24
0,29	0,29	0,28	0,29	0,27	0,28
0,30	0,30	0,32	0,31	0,27	0,30
0,31	0,30	0,30	0,29	0,30	0,31
0,34	0,36	0,35	0,35	0,31	0,32
0,30	0,33	0,33	0,30	0,28	0,28
0,35	0,38	0,37	0,34	0,33	0,34
0,38	0,42	0,38	0,37	0,37	0,38
0,20	0,22	0,22	0,22	0,18	0,19
0,31	0,34	0,30	0,31	0,28	0,29
0,30	0,32	0,30	0,30	0,29	0,29
0,38	0,39	0,40	0,41	0,36	0,42
0,39	0,41	0,42	0,43	0,39	0,43
0,35	0,34	0,38	0,37	0,29	0,36
0,39	0,38	0,42	0,42	0,39	0,40
0,41	0,41	0,42	0,44	0,39	0,43
0,42	0,44	0,46	0,45	0,39	0,44
0,38	0,38	0,41	0,40	0,36	0,38
0,36	0,37	0,39	0,39	0,35	0,41
0,38	0,39	0,40	0,42	0,36	0,40
0,48	0,48	0,50	0,48	0,48	0,49
0,53	0,56	0,59	0,54	0,52	0,56
0,56	0,56	0,61	0,56	0,54	0,57
0,53	0,59	0,59	0,53	0,52	0,54
0,55	0,58	0,60	0,55	0,54	0,54
0,57	0,57	0,58	0,54	0,50	0,50
0,57	0,57	0,57	0,54	0,49	0,50
0,53	0,53	0,57	0,53	0,51	0,48
0,57	0,58	0,62	0,60	0,52	0,54
0,55	0,54	0,60	0,57	0,55	0,60
0,68	0,68	0,66	0,65	0,58	0,59
0,53	0,56	0,57	0,55	0,47	0,52
0,63	0,61	0,65	0,61	0,57	0,56

0,57	0,58	0,59	0,54	0,55	0,51
0,57	0,57	0,59	0,56	0,51	0,51
0,63	0,61	0,58	0,61	0,55	0,55
0,56	0,56	0,57	0,55	0,53	0,54
0,51	0,54	0,56	0,52	0,47	0,48
0,49	0,52	0,54	0,50	0,46	0,46
0,56	0,58	0,59	0,56	0,53	0,54
0,50	0,50	0,53	0,50	0,47	0,50
0,45	0,51	0,52	0,50	0,50	0,51
0,53	0,52	0,54	0,52	0,51	0,48
0,60	0,57	0,54	0,57	0,51	0,51
0,46	0,44	0,44	0,45	0,45	0,41
0,55	0,52	0,50	0,51	0,49	0,49
0,61	0,66	0,58	0,61	0,57	0,62
0,78	0,73	0,70	0,72	0,67	0,70
	0,74	0,74	0,76	0,69	0,71
0,74		0,78	0,76	0,68	0,70
0,74	0,78		0,78	0,70	0,70
0,76	0,76	0,78		0,71	0,72
0,69	0,68	0,70	0,71		0,79
0,71	0,70	0,70	0,72	0,79	