

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

Ricardo Manoel dos Santos Silva

Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., suas relações antagônicas e atividade antioxidante de seus extratos.

Maceió

2011

Ricardo Manoel dos Santos Silva

Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., suas relações antagônicas e atividade antioxidante de seus extratos.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

Maceió

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586i Silva, Ricardo Manoel dos Santos.
Isolamento e identificação de fungos endófitos de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Bameby & Grimes e *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., suas relações antagônicas e atividade antioxidante de seus extratos / Ricardo Manoel dos Santos Silva. – 2011.
160 f. : il. tabs., graf.

Orientador: Luiz Carlos Caetano.

Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 115-125.

Anexos: f. 126-128.

Apêndices: f. 129-160.

1. Fungos endófitos. 2. Atividade anti-oxidante. 3. *Abarema cochliocarpos*. 4. *Dalbergia ecastophyllum*. 5. Produtos naturais. I. Título.

CDU: 547.9:582.282




UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

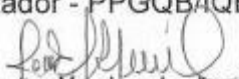


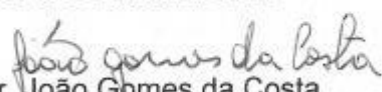
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

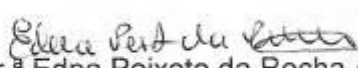
Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de **Ricardo Manoel dos Santos Silva**, intitulada: **"Isolamento e Identificação de Fungos Endofíticos de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. Suas Relações Antagônicas e Atividade Antioxidante de Seus Extratos"**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 11 de maio de 2011, às 9h, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.


COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano
Orientador - PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
PPGQB/ESENFAR/UFAL


Prof. Dr. João Gomes da Costa
EMBRAPA-AL


Prof.ª Dr.ª Edna Peixoto da Rocha Amorim
PPPV/CECA/UFAL


Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto
PPGCS/ICBS/UFAL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo imenso milagre que é estar vivo e pela nítida noção que, inevitavelmente, cada dia é um novo começo. A vida é feita a cada dia, um de cada vez.

Agradeço a Fapeal e a Capes por disponibilizarem a minha bolsa de doutorado.

Agradeço ao professor Doutor Luiz Carlos Caetano por todo o tempo, paciência e conhecimentos investidos neste empreendimento que foi me orientar nestes anos. Sem você tudo seria diferente.

Agradeço ao professor Doutor Luiz Antônio ferreira da Silva e todos do Laboratório de DNA Forense e Diagnóstico Molecular da Universidade Federal de Alagoas pelo trabalho de colaboração na análise molecular dos fungos.

Agradeço a todos os professores do Instituto de Química e Biotecnologia por auxiliarem na minha formação acadêmica.

Agradeço a minha família por me educar de forma excepcional sempre mostrando valores sólidos, limites e respeito ao próximo em um mundo como o de hoje. Amo todos do fundo do meu coração.

Agradeço aos meus colegas de infância e que hoje são meus amigos/irmãos por sempre cobrarem de forma veemente a minha presença em todos os momentos de suas vidas. Amizade verdadeira não se abala com o tempo nem com a distância. Amo todos vocês.

Agradeço aos colegas que encontrei no laboratório pelas trocas de experiência, ajuda e momentos incríveis de descontração. Várias pessoas entraram e saíram do laboratório, outros ainda estão nele, só gostaria de expressar a imensa admiração e respeito que sinto por todos. Vocês são e sempre serão maiores que as paredes que os cercam.

*Dedico este trabalho aos meus pais Everaldo
Alves da Silva e Maria Valerita dos Santos
Silva.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral:	19
2.2	Objetivos específicos:	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1	Microrganismos endofíticos	20
3.1.1	Considerações gerais.....	20
3.1.2	Microrganismos endofíticos e plantas medicinais	22
3.2	Antagonismo entre microrganismos	27
3.3	Produção de substâncias antioxidantes por fungos endofíticos.	32
4	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>ABAREMA COCHLIOCARPOS</i> (GOMES) BARNEBY & GRIMES E <i>DALBERGIA ECASTOPHYLLUM</i> (L.) TAUB.	34
4.1	Introdução	34
4.2	Material e Métodos	36
4.2.1	Escolha das espécies vegetais e local de coleta.....	36
4.2.2	Preparo dos meios de cultura para o isolamento de fungos endofíticos de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes e <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub.	36
4.2.3	Coleta do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes e <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub.....	38
4.2.4	Identificação dos endofíticos através de técnicas moleculares.....	41
4.2.5	Manutenção dos fungos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes e <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub.....	46
4.3	Resultados e Discussão	47
4.4	Conclusão	66
5	EFEITO DE CONDIÇÕES ABIÓTICAS IMPOSTAS <i>IN VITRO</i> SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE <i>A. COCHLIOCARPOS</i> E <i>D. ECASTOPHYLLUM</i>.	67
5.1	Introdução	67
5.2	Materiais e Métodos	69
5.2.1	Preparação dos meios de cultura utilizados para o experimento sobre o crescimento radial dos fungos endofíticos isolados.	69
5.2.2	Preparação da iluminação utilizada para o experimento sobre crescimento radial dos	

fungos endofíticos isolados.	72
5.2.3 Influência do meio de cultura e da iluminação in vitro sobre o crescimento radial dos fungos endofíticos isolados.	72
5.2.4 Delineamento experimental e análise estatística.	73
5.3 Resultados e discussão	74
5.4 Conclusão	78
6 INTER-RELAÇÕES OBSERVADAS ENTRE OS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE <i>A. COCHLIOCARPOS</i> . E <i>D. ECASTOPHYLLUM</i>	79
6.1 Introdução	79
6.2 Material e Métodos	81
6.2.1 Método de crescimento pareado em meio de cultura.	81
6.2.2 Análise estatística do experimento de crescimento pareado em meio de cultura.....	82
6.3 Resultados e Discussão	83
6.3.1 Cultura pareada do fungo endofítico <i>Guignardia</i> sp. (AcF2) isolado de <i>A. cochliocarpos</i> e os demais fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	87
6.3.2 Cultura pareada do fungo endofítico da ordem Pleosporales (AcF3) isolado de <i>A. cochliocarpos</i> e os demais fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	90
6.3.3 Cultura pareada do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. (DeF1) isolado de <i>D. ecastophyllum</i> e os demais fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	93
6.3.4 Cultura pareada do fungo endofítico DeF2 isolado de <i>D. ecastophyllum</i> e os demais fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	96
6.3.5 Cultura pareada do fungo endofítico <i>Nigrospora</i> sp. (DeNs) isolado de <i>D. ecastophyllum</i> e os demais fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	99
6.4 Conclusão	102
7 PRODUÇÃO DE EXTRATOS A PARTIR DO MICÉLIO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE <i>A. COCHLIOCARPOS</i> E <i>D. ECASTOPHYLLUM</i> E ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DESTES	103
7.1 Introdução	103
7.2 Material e Métodos	105
7.2.1 Preparação dos meios de cultura na produção de biomassa dos fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	105
7.2.2 Efeito da agitação do meio de cultura na produção de biomassa.	105

7.2.3	Análise estatística.	106
7.2.4	Preparação dos extratos produzidos pelos fungos endofíticos.	106
7.2.5	Avaliação qualitativa da presença de alcalóides e compostos fenólicos.....	106
7.2.6	Avaliação Qualitativa do Potencial Antioxidante	106
7.2.7	Avaliação Quantitativa do Potencial Antioxidante dos extratos obtidos dos fungos endofíticos isolados.....	107
7.2.8	Preparo das Soluções e Construção da Curva de Calibração do DPPH	107
7.2.9	Preparo das Amostras e Determinação de CI_{50}	108
7.3	Resultados e discussão	110
7.4	Conclusão	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXOS.....	126
	ANEXO A– Declaração de depósito das excicatas de <i>D. Ecastophyllum</i> no IMA.	127
	ANEXO B- Declaração de depósito das excicatas de <i>A. cochliocarpos</i> no IMA.	128
	APÊNDICES	129
	APÊNDICE A– Análise estatísticas dos experimentos em que foram submetidos os fungos endofíticos isolados.....	130
	APÊNDICE B- Cromatoplasmas para identificação de alcalóides e compostos fenólicos com extratos dos fungos endofíticos.	158
	APÊNDICE C– Cromatoplasmas para identificação de atividade antioxidante de extratos de fungos isolados	159
	APÊNDICE D– Curvas de calibração utilizadas nos experimentos de atividade antioxidante dos extratos dos fungos endofíticos isolados.....	160

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem de satélite da região onde é localizado o Arboretum da Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, onde foi coletada da espécie <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes.....	38
Figura 2- Imagem de satélite da região de restinga ao lado do complexo lagunar Mundaú-Manguaba local de coleta da espécie <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub.	39
Figura 3- Árvores da espécie <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes localizadas no Arboretum da UFAL utilizadas para coleta de ramos para o isolamento de fungos endofíticos.	39
Figura 4- Ramos com flores e frutos de <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub. encontrados na região de restinga localizado ao lado do complexo lagunar Mundaú-Manguaba.....	40
Figura 5-Modelo do cluster gênico que codifica para RNA ribossômico.....	43
Figura 6- Aspecto da colônia do fungo AcF1 isolado de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a 28±1°C e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B- visão inferior da placa de Petri.	47
Figura 7-Aspecto da colônia do fungo AcF2 isolado de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a 28±1°C e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - visão inferior da placa de Petri.	48
Figura 8- Aspecto da colônia do fungo AcF3 isolado de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a 28±1°C e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - visão inferior da placa de Petri.....	49
Figura 9-Aspecto da colônia do fungo DeF1 isolado de <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub. crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a 28±1°C e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - visão inferior da placa de Petri.	49
Figura 10- Aspecto da colônia do fungo DeF2 isolado de <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub. crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a 28±1°C e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - direita visão inferior da placa de Petri.	50
Figura 11-Aspecto da colônia do fungo DeNs isolado de <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub. crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a 28±1°C e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - visão inferior da placa de Petri.	50
Figura 12 – Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico AcF1 de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes.	53
Figura 13 - Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico AcF2 de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes.	56

Figura 14- Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico AcF3 de <i>A. cochliocarpos</i> (Gomes) Barneby & Grimes.	59
Figura 15 - Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico DeF1 de <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub.	62
Figura 16 - Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico DeNs de <i>D. ecastophyllum</i> (L.) Taub.	64
Figura 17- Cultura pareada do fungo <i>Phomopsis</i> sp. (AcF1) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo <i>Phomopsis</i> sp. (AcF1) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em C e D; a direita nas demais placas estão os fungos: <i>Guignardia</i> sp. em E e F; Fungo da ordem Pleosporales em G e H; <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>D. ecastophyllum</i> I e J; fungo DeF2 em L e M; <i>Nigrospora</i> sp. em N e O.	85
Figura 18-Antagonismo entre o fungo <i>Phomopsis</i> sp. (AcF1) e os demais fungos endofíticos isolados de <i>A.cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i> . □=Média; Barras =desvio padrão; n=4; Ac =isolado de <i>A. cochliocarpos</i> ; De = isolado de <i>D. ecastophyllum</i> . Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.	86
Figura 19- Cultura pareada do fungo <i>Guignardia</i> sp. (AcF2) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo <i>Gruignardia</i> sp. (AcF2) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em E e F; a direita nas demais placas: <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>A. cochliocarpos</i> em C e D; Fungo da ordem Pleosporales em G e H; <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>D. ecastophyllum</i> I e J; fungo DeF2 em L e M; <i>Nigrospora</i> sp. em N e O.	88
Figura 20- Antagonismo entre o fungo <i>Guignardia</i> sp. (AcF2) e os demais fungos endofíticos isolados de <i>A.cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i> . □=Média; Barras =desvio padrão; n=4; Ac =isolado de <i>A. cochliocarpos</i> ; De = isolado de <i>D. ecastophyllum</i> . Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.	89
Figura 21- Cultura pareada do fungo da ordem Pleosporales. (AcF3) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo da ordem Pleosporales (AcF3) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em G e H; a direita nas demais placas: <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>A. cochliocarpos</i> em C e D; <i>Guignardia</i> sp. em E e F; <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>D. ecastophyllum</i> I e J; fungo DeF2 em L e M; <i>Nigrospora</i> sp. em N e O.....	91
Figura 22- Antagonismo entre o fungo da ordem Pleosporales (AcF3) e os demais fungos endofíticos isolados de <i>A.cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i> . □=Média; Barras = desvio	

padrão; n = 4; Ac = isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade 92

Figura 23-Cultura pareada do fungo *Phomopsis* sp. (DeF1) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo *Phomopsis* sp. (DeF1) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em I e J; a direita nas demais placas: *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* em C e D; *Guignardia* sp. em E e F; fungo da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos* em G e H; fungo DeF2 em L e M; *Nigrospora* sp. em N e O. 94

Figura 24- Antagonismo entre o fungo *Phomopsis* sp. (DeF1) isolado de *D. ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A.cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras = desvio padrão; n = 4; Ac = isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade..... 95

Figura 25- Cultura pareada do fungo DeF2 entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo DeF2 se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em L e M; a direita nas demais placas: *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* em C e D; *Guignardia* sp. em E e F; fungo da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos* em G e H; fungo *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* em I e J; *Nigrospora* sp. em N e O..... 97

Figura 26- Antagonismo entre o fungo DeF2 isolado de *D. ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A.cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras = desvio padrão; n = 4; Ac = isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. 98

Figura 27- Cultura pareada do fungo *Nigrospora* sp. (DeNs) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo *Nigrospora* sp. (DeNs) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em N e O; a direita nas demais placas: *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* em C e D; *Guignardia* sp. em E e F; fungo da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos* em G e H; fungo *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* em I e J; DeF2. em L e M. 100

Figura 28- Antagonismo entre o fungo *Nigrospora* sp. isolado de *D. ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A.cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras = desvio padrão; n = 4; Ac = isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*.

Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- <i>Primers</i> específicos utilizados na reação de PCR para amplificação do rDNA.	43
Tabela 2-Condições para amplificação mostrando os reagentes constituintes da reação de PCR.	44
Tabela 3- Reagentes utilizados na reação para seqüenciamento com suas respectivas quantidades.	45
Tabela 4-Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo AcF1.	52
Tabela 5- Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo AcF2.	55
Tabela 6. Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo AcF3.	58
Tabela 7- Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo DeF1.	61
Tabela 8-Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo DeNs, organismo, identidade genética, número de acesso.	63
Tabela 9-Identificação de fungos endofíticos isolados de suas plantas hospedeiras.	65
Tabela 10- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>A. cochliocarpos</i>	74
Tabela 11- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo <i>Guignardia</i> sp. isolado de <i>A. cochliocarpos</i>	75
Tabela 12- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico da ordem Pleosporales isolado de <i>A. cochliocarpos</i>	76
Tabela 13- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>D. ecastophyllum</i>	76
Tabela 14- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico DeF2 isolado de <i>D. ecastophyllum</i>	77
Tabela 15- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico <i>Nigrospora</i> sp. isolado de <i>D. ecastophyllum</i>	77
Tabela 16- Possíveis combinações utilizadas <i>in vitro</i> para crescimento pareado em meio de cultura entre os fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	81
Tabela 17- Concentrações utilizadas dos extratos dos fungos endofíticos para determinação da CI ₅₀	109
Tabela 18- Efeito da agitação do meio de cultura sobre a matéria seca (g) dos fungos	

endofíticos isolados de <i>Abarema cochliocarpos</i> e <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	110
Tabela 19-Massa seca e rendimento dos extratos obtidos pela ação de solventes de diferentes polaridades sobre a biomassa dos fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	111
Tabela 20.- Análise qualitativa da presença de alcalóides e compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos dos fungos endofíticos isolados.....	112
Tabela 21- Porcentagem de atividade antioxidante (AA%) dos controles e dos extratos obtidos a partir de solvente de diferentes polaridades da biomassa seca dos fungos endofíticos isolados de <i>A. cochliocarpos</i> e <i>D. ecastophyllum</i>	113

RESUMO

A procura de novas substâncias de interesse na área farmacêutica ou mesmo agroindústria nos mais variados usos, tem levado os pesquisadores a buscar alternativas antes não devidamente exploradas. Uma dessas alternativas seria o isolamento de microrganismos que habitam vegetais de forma assintomática para a produção novas substâncias, estudos tem demonstrado que estes microrganismos, chamados de endofíticos, através da coevolução em suas plantas hospedeiras, tem conferido a elas diversos benefícios como proteção e resistência ao ataque de pragas. Paralelamente, é visto que muitos compostos produzidos pelas plantas hospedeiras, também podem ser produzidos por esses microrganismos, e com isso a sua produção industrial poderia ser facilitada. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar fungos endofíticos de duas espécies vegetais a *A. cochliocarpos* e a *D. ecastophyllum* conhecidas popularmente como barbatimão e rabo-de-bugio, respectivamente, bem como analisar suas inter-relações entre os fungos isolados e a atividade antioxidante também são objetivos deste trabalho. Foram isolados seis fungos endofíticos. Destes, cinco foram identificados como sendo dois fungos do gênero *Phomopsis*, um fungo do gênero *Guignardia* e um identificado como sendo da ordem Pleosporales, o quinto fungo identificado foi do gênero *Nigrospora*. Um dos fungos não pôde ser identificado pela técnica utilizada e foi chamado de DeF2. Os fungos tiveram crescimento superior quando mantidos em ambiente escuro e em meio de cultura BDA e BSA em laboratório. Como antagonistas, foi possível observar que os isolados provindos do hospedeiro *D. ecastophyllum* foram os mais eficientes e que um mesmo gênero pode apresentar comportamentos diferenciados dependendo do hospedeiro que foi originado. A partir de experimentos realizados com micélios destes fungos foi possível obter extratos orgânicos de diferentes polaridades e, a análise da atividade antioxidante destes extratos, mostrou que o fungo *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* apresentou extratos com atividade antioxidante superior aos de outros fungos analisados.

Palavras-chave: Fungos endofíticos. Antagonismo. Atividade antioxidante

ABSTRACT

The search for new substances of pharmaceutical interest in the area or even in the most diverse agricultural industry uses, has led researchers to seek alternatives before not properly explored. One such alternative would be to isolate the microorganisms that inhabit plant asymptotically to produce new substances, studies have shown that these microorganisms, called endophytes, through the coevolution of host plants, has given them many benefits such as protection and resistance pest attack. In parallel, it is seen that many compounds produced by host plants, can also be produced by these microorganisms, and thus its industrial production could be facilitated. This study aimed to isolate and identify fungal endophytes from two species *A. cochliocarpos* and *D. ecstophyllum* popularly known as barbatimão and rabo – de- bugio, respectively, and to examine its antagonism between fungi isolated and the antioxidant activity are also the focus of this work. Endophytic fungi were isolated from six. Of these, five were identified as two of the genus *Phomopsis* fungi, a fungus of the genus *Guignardia* and one identified as being of order Pleosporales, the fungus was identified as the fifth genus *Nigrospora*. One of the fungus could not be identified by the technique used and was called DeF2. The fungi grew better when kept in dark on PDA growth medium and BSA in the laboratory. As antagonists, we observed that the isolates coming from the host *D. ecstophyllum* were the most efficient and that one gender may have different behaviors depending on the host that originated. From experiments with mycelia of these fungi were obtained organic extrados of different polarities, and the analysis of the antioxidant activity of these extracts showed that the fungus *Phomopsis* sp. isolated from *D. ecstophyllum* presented extracts with antioxidant activity than those of other fungi analyzed.

Keywords: Endophytic fungi. Antagonism. Antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

A busca por substâncias de interesse em diversas aplicações e a manipulação de moléculas com esta mesma finalidade são questões que tem demandado empenho da classe científica por muitos anos. Neste contexto, os vegetais, desde épocas remotas, têm sido utilizados, principalmente no tratamento de vários males como acontece com os fitoterápicos, transformando o conhecimento das comunidades locais sobre as plantas em comprovações científicas. Segundo Silva et al. (2006) a riqueza em flora medicinal apresentada pela região Nordeste, é tão grande quanto o conhecimento popular a ela associado. As pessoas que conhecem essas plantas colaboram para seu cultivo e preservação, selecionando as plantas de seu interesse, mantendo-se sua diversidade biológica.

Naturalmente, os valores terapêuticos das plantas medicinais estão ligados a vários fatores entre eles o ambiental que envolve, por exemplo, o tipo de solo, o índice pluviométrico em que a espécie é cultivada ou coletada, o fator fisiológico que lida com o estado de maturação da planta, se apresenta flores ou frutos entre outros. O papel da ciência sempre focou no estabelecimento da melhor condição para a produção destas substâncias de uso terapêutico de forma menos nociva ao homem e, atualmente, com maior preocupação em não agredir o meio ambiente. Devido ao grande número de variáveis que devem ser controladas, são comumente encontradas variações nas concentrações quanto no número de substâncias ativas nessas plantas.

A análise da sanidade da produção e da pós-colheita é feita de forma a descartar o material contaminado, não levando em conta a presença de microrganismos que se desenvolvem no vegetal de forma assintomática.

Azevedo (1998) mostra em seu trabalho que microrganismos como fungos e bactérias que habitam o interior de vegetais, vivendo, de modo geral, em suas partes aéreas como folhas e ramos sem causar nenhum dano aparente aos seus hospedeiros são conhecidos como endofíticos ou ainda endófitos. Devido a isso, são distintos dos microrganismos epifíticos, que habitam a superfície dos hospedeiros e dos fitopatógenos que são aqueles que provocam doenças em plantas. Tais definições ou distinções são meramente didáticas tendo em vista que vários gêneros ou mesmo espécies de microrganismos em algum momento podem se situar em algum destes grupos. Dessa forma, de acordo com as condições ambientais e fisiológicas do hospedeiro um fitopatógeno latente, pode ser considerado endofítico, assim como, um microrganismo epifítico pode eventualmente habitar o interior de um vegetal e, devido a isto, ser erroneamente considerado como endofítico.

A diversidade de espécies em comunidades endofíticas pode ser grande. Algumas espécies de árvores podem hospedar mais de 100 espécies em um único tipo de tecido, mas as comunidades são geralmente dominadas por poucas espécies específicas (Sieber, 2007).

Azevedo (1998) acrescenta que provavelmente todos os vegetais apresentem microrganismos endofíticos em seu interior. Uma planta pode ter em seu interior vários deles, incluindo fungos e bactérias. Em geral, existem espécies de microrganismos mais frequentes em um determinado hospedeiro e por isso são chamados de dominantes e outras mais raras que são consideradas como secundárias.

O estabelecimento dos vegetais nos habitats envolve a habilidade deles de interagir com diferentes espécies de seres vivos. Entre estas associações, destacam-se as mutualísticas com microrganismos como os fungos micorrízicos e as bactérias fixadoras de nitrogênio. Outros microrganismos, como os endófitos têm recebido especial atenção devido à sua importância em relação a diferentes espécies vegetais. Neste contexto, o emprego de microrganismos em práticas agrícolas tem aumentado substancialmente, pois, tanto na promoção de crescimento vegetal como no controle biológico de pragas e doenças de plantas entre outras aplicações, eles se constituem em substitutos de produtos químicos, favorecendo desta maneira a preservação do ambiente (Peixoto Neto et al., 2002).

Os microrganismos endofíticos geralmente utilizam aberturas naturais e feridas para entrarem em seus hospedeiros. As raízes são uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endófitos, juntamente com os estômatos e hidatódios. Aberturas causadas por diversos outros motivos são utilizadas pelos microrganismos endofíticos para adentrarem seus hospedeiros, tais como, aquelas causadas por insetos ou mesmo no momento da colheita de frutos e outros órgãos vegetais (Azevedo, 1998).

Plantas hospedeiras de microrganismos endofíticos podem ser afetadas de diversas formas, como a produção de compostos com atividades biológicas que apresentam toxicidade, como no caso de fungos endofíticos produtores de alcalóides responsáveis pela proteção das gramíneas forrageiras contra herbívoros. A síntese de substâncias tóxicas também pode ser estimulada pela presença de enzimas ou outros compostos dos microrganismos endofíticos, que atuando sobre certos genes da planta promovem a biossíntese destes metabólitos secundários tóxicos. Para a planta este estímulo aumenta o seu desempenho neste habitat, reduzindo a herbivoria sobre ela (Peixoto Neto et al., 2002).

No Brasil a grande maioria das investigações de fontes de novos fármacos estão concentradas em vegetais (BRAZ-F^o, 1994). Mas, microrganismos são considerados uma das fontes mais promissoras de novos metabólitos, os quais apresentam inúmeras aplicações

biotecnológicas (STROBEL et al., 2004). Os microrganismos são produtores de enzimas, agentes antibióticos, antitumorais, imunossupressores, antiparasitários e outros de interesse industrial e farmacêutico (DEMAIN, 1999).

Entre os microrganismos, os fungos constituem um dos grupos menos estudados quanto aos seus metabólitos secundários (STROBEL et al., 1996). Estimativas apontam que apenas 5% das espécies de fungos estejam descritas (HAWKSWORTH, 2001) e entre essas, a maioria não foi avaliada como fonte de substâncias bioativas (PEARCE, 1997), ficando evidente a grande potencialidade desses microrganismos em programas de bioprospecção.

Aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem substâncias que são ativas em bioensaios, 51% dessas substâncias são estruturalmente desconhecidas, contra 38% observada para fungos de solos (SCHULZ e BOYLE, 2005). Portanto, os fungos endofíticos são uma das fontes mais promissoras de novos protótipos para desenvolvimento de substâncias de interesse entre os microrganismos (STROBEL, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Isolar e identificar fungos endofíticos a partir de plantas de barbatimão, *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes, e rabo-de-bugio, *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., caracterizar suas inter-relações e atividade antioxidante dos extratos obtidos.

2.2 Objetivos específicos:

Isolar fungos endofíticos a partir de tecidos sadios de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*;

Identificar os fungos endofíticos isolados;

Identificar entre as condições abióticas impostas *in vitro* aos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum* aquelas que propiciam maior crescimento.

Identificar as inter-relações entre os isolados obtidos;

Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Microrganismos endofíticos

3.1.1 Considerações gerais

Durante as últimas cinco décadas, a técnica da cultura de células e tecidos vegetais tem sido utilizada na produção de importantes princípios ativos medicinais, com o objetivo de aprimorar o processo produtivo e também de preservar as fontes nativas produtoras de tais princípios. Na última década uma nova alternativa para a produção de importantes compostos medicinais tem chamado à atenção de pesquisadores: o cultivo de microrganismos endofíticos (NIH, 2001).

No início do século XIX os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez, mas quem primeiro os diferenciou dos patógenos de plantas foi Bary, em 1866 (Azevedo, 1999). Endofíticos são microrganismos que, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior de tecidos vegetais, sem causar-lhes danos aparentes. Embora estes microrganismos, geralmente fungos e bactérias, possam ser confundidos com patógenos latentes, estudos verificaram que em muitos casos existe uma importante interação simbiótica com o hospedeiro, a qual envolve a produção de compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou conferem resistência a patógenos, ou produção de fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal. Em contrapartida, os endofíticos poderiam encontrar na planta um habitat com muito nutriente e com menor competição com outros microrganismos.

As interações entre microrganismos e plantas são relatadas há várias décadas. Durante muito tempo havia uma grande confusão do real papel destes microrganismos, acreditando-se que estes causavam sérios prejuízos para a planta, reduzindo as produtividades médias, assim sendo denominados de fitopatógenos. Há algumas décadas atrás, descobriu-se a presença de microrganismos nos tecidos vegetais assintomáticos, abrindo desta forma novas perspectivas para o estudo das interações plantas/microrganismos (Azevedo, 2000).

A distinção realizada entre endofíticos e os epifíticos (colonizam a parte exterior das diversas partes das plantas) é meramente didática, mas pode-se diferenciá-los devido as suas relações do tipo simbiótica durante pelo menos um ciclo da vida da planta (Petrini, 1991).

Estas relações mutualísticas são tão importantes que levaram Carroll (1988) a considerar o termo “endofítico” como sinônimo de “mutualismo”. Para Bacon e Hinton

(1997) estes microrganismos vivem dentro da planta, não como patógenos, apesar de poder existir um grau moderado de patogenicidade, capaz de ser expresso, ocupando os espaços intercelulares das plantas e utilizando-se dos nutrientes apoplásticos.

Estas interações microbiota/planta, relativas ao aumento da resistência a doenças ainda não está totalmente elucidado, mas alguns trabalhos demonstram que em alguns casos este aumento da resistência está relacionado com reações de hipersensibilidade, ativando a resistência sistêmica da planta, como já observado em *Lycopersicon esculentum* (L.) H. Karst. (Duijff et al., 1997). Em *Solanum tuberosum* L., a inoculação da bactéria endofítica *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN) promove o estímulo a produção de lignina, aumenta seu teor em torno dos tecidos vasculares (Frommel et al., 1991). Suto et al. (2002) isolaram de 14 plantas 169 fungos endofíticos e 81 bactérias endofíticas para avaliar a produção de xylanase. A produção de xylanase ocorreu em 91,7% dos fungos e em 64% das bactérias. Os autores concluíram que os endofíticos são fontes novas e boas para a produção de xylanase. Silva et al. (2006a) verificaram que alguns fungos endofíticos isolados de pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.) promoveram o crescimento da parte aérea de mudas de pinha. A giberelina, hormônio responsável pelo alongamento do caule, foi produzida pelo fungo endofítico *Fusarium moniliforme* (Azevedo, 1998). A presença do fungo endofítico *Beauveria bassiana* em banana (*Musa* ssp.) reduziu significativamente a sobrevivência das larvas de *Cosmopolites sordidus* agente causador do gorgulho em bananeiras (Akello, 2008).

Outro tipo de proteção que os endofíticos podem proporcionar a planta hospedeira é o efeito repelente a insetos que são responsáveis pela transmissão de várias doenças, principalmente as causadas por vírus. Daisy (2002) isolou o fungo endofítico *Muscodor vitigenus* de *Paullinia paullinioides*, o qual produziu naftaleno, um conhecido repelente de insetos. Alguns endofíticos foram testados quanto a sua ação nematicida. *Fusarium oxysporum* e uma espécie de *Trichoderma* foram utilizados no melhoramento de banana, tomate e arroz, como biocontroladores de nematóides. Foi observada uma redução significativa do número de nematóides colonizando essas culturas (Sikora, 2008).

A potencialidade herbicida dos metabólitos produzidos por endofíticos está sendo testada. Santos (2008) testou os extratos obtidos da biomassa do fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*, oriundo de *Virola michelii*, na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas de duas espécies de plantas infestantes, *Mimosa pudica* L. e *Senna obtusifolia* L. Irwin & Barneby. Foi observado que os extratos apresentaram atividade herbicida, havendo variações no potencial inibitório, sendo que a germinação de sementes mostrou-se mais sensível aos efeitos do que o desenvolvimento das plântulas.

Alguns estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de demonstrar que os endofíticos também produzem compostos com atividade antioxidante. Chomcheon (2009) isolou diversos compostos produzidos pelo fungo endofítico *Corynespora cassiicola* e alguns desses demonstraram potente atividade antioxidante.

A produção de metabólitos secundários pelos fungos endofíticos pode ser influenciada tanto pela planta a qual está associado, como também pela região onde a planta encontra-se. No estudo desenvolvido por Bills (2002) foi feita uma comparação entre os fungos endofíticos encontrados em regiões tropicais e os oriundos das regiões temperadas. Com base nos dados estatísticos foi constatado que as regiões tropicais são mais ricas tanto na ocorrência de endofíticos quanto na produção de metabólitos secundários.

O clima pode influenciar na colonização das plantas pelos endofíticos. A flutuação sazonal dos endofíticos foi demonstrada por Gao (2005). Estudando a diversidade de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Heterosmilax japonica* Kunth., os autores verificaram que a população de endofíticos foi mais abundante na primavera do que durante o verão. Naik et al. (2008) estudaram quinze plantas medicinais do sul da Índia, no período do inverno e no verão. Os pesquisadores isolaram 6.125 fungos endofíticos, sendo *Alternaria*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phyllosticta* e *Xylaria* os gêneros mais freqüentes. Observaram que o maior número de isolados foi obtido durante o inverno. Rudgers e Swafford (2009) demonstraram que os endofíticos beneficiaram a planta *Elymus virginicus* L. tornando-a tolerante ao estresse hídrico, ou seja, proporcionaram uma maior resistência à seca. Nas plantas da mesma espécie que tiveram o fungo endofítico *Epichloë elymi* removido, houve uma redução em sua biomassa.

As diferentes formas de cultivo de plantas podem influenciar significativamente na comunidade endofítica. Em três diferentes sistemas de cultivos de macieiras (*Malus domestica* Borkh.), no sul do Brasil, foram isolados fungos endofíticos de folhas, flores e frutos. Foi verificado que no cultivo orgânico a proporção de endofíticos isolados foi bem maior do que nos sistemas de cultivo convencional e integrado. Dos gêneros mais freqüentes destacaram-se *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Botryosphaeria* (Camatti-Sartori, 2005).

3.1.2 Microrganismos endofíticos e plantas medicinais

É preocupante o aumento do número de pessoas no mundo que apresentam problemas de saúde causados por certos tipos de cânceres, infecções por fungos e bactérias multirresistentes aos mais modernos antibióticos, e por protozoários parasitas. É necessário

cada vez mais buscar novos e mais efetivos agentes medicinais para lidar com estes problemas, que beneficiam não somente a saúde humana como também a de plantas e animais.

No início da década de 90, trabalhos realizados por Stierle et al. (1995) demonstraram que um fungo endofítico denominado de *Taxomyces andreane* do floema de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), era capaz de biossintetizar o diterpenóide, taxol, considerado um dos compostos de maior valor biotecnológico, cuja cotação no mercado internacional chegou a cerca de US\$ 8.424,00/g, conforme dados do Catálogo Sigma 2000-2001. Esta descoberta causou uma verdadeira revolução no estudo dos microrganismos endofíticos, uma vez que pela primeira vez, alguém conseguiu provar cientificamente que um microrganismo endofítico era capaz de produzir um composto que se acreditava ser somente possível em plantas do gênero *Taxus*.

Fontes alternativas de compostos de grande valor agregado são de suma importância, não somente para torná-los mais acessíveis à população mais carente, mas também para garantir a preservação de muitas espécies. A descoberta de taxol é notadamente importante, visto que este é produzido em quantidades muito pequenas por esta conífera, tanto que segundo Kieran et al. (1997) para obter-se 1 Kg de taxol são necessários cascas de mais de 1000 árvores, cada uma com 100 anos de idade, o que quase levou a extinção dessa espécie. Outros trabalhos também têm conseguido comprovar que outros fungos endofíticos produzem taxol, como *Pestalotiopsis microspora* isolado da *T. wallachiana* (Strobel et al., 1996); *P. guelpinii* isolado de *Wollemia nobilis* W. G. Jones, K. D. Hill & J. M. Allen (Strobel, 1997); *Seimatoantlerium tepuiense* obtido de *Maguireothammus speciosus* (Strobel et al., 1999a); *Periconia* sp. isolado de *Torreya grandiflora* Raf. (Li et al., 1998); *Sporormia minima* e *Trichothecium* sp. isolados da planta medicinal *T. wallichiana* Zucc. (Shrestha et al., 2001); *Bartalinia robillardoides* obtido de *Aegle marmelos* Corrêa (Gangadevi e Muthumary, 2008); *Pestalotiopsis pauciseta* oriundo das folhas da planta medicinal *Cardiospermum helicacabum* L. (Gangadevi et al., 2008); e *Fusarium mairei* isolado de *Taxus cuspidata* Siebold & Zucc. (Li et al., 2009). Portanto, a produção de taxol por todos esses endofíticos, demonstra que o taxol é de distribuição mundial, não estando confinado a endofíticos isolados de plantas da família Taxaceae (Strobel e Long, 1998).

Posteriormente foram descobertos outros endofíticos produzindo os mesmos metabólitos secundários que são produzidos pela planta a qual está associado, a exemplo do fungo *Mycelia sterilia* que produz a vincristina, uma substância anticancerígena, isolada da planta *Catharanthus roseus* G. Don., a qual o *M. sterilia* está associado (Yang, 2004). Temos

outro exemplo, como derivados do ácido giberélico que é produzido pela planta *Cucurbita maxima* Duch., tendo sido também isolado do fungo *Gibberela fugikuroi* que vive associado a essa planta.

Entretanto, não é somente na produção de compostos já conhecidos que estes microrganismos têm seu valor, pois inúmeros trabalhos têm demonstrado que se apresentam também como promissora fonte de outros metabólitos secundários de grande atividade biológica, dentre eles pode-se destacar os trabalhos realizados por Huang et al. (2001) que demonstraram a potente atividade antitumoral e antifúngica de vários endofíticos isolados de *Taxus mairei* (Lemee & H. Lév.) S. Y. Hu, *Cephalataxus fortunei* Hook. e *Torreya grandis* Fortune ex Gordon importantes plantas medicinais chinesas. Wang et al. (2002) isolaram de *Taxus mairei* e *Torreya grandis* os endofíticos *Paecilomyces* sp. e *Aspergillus clavatus*. Esses endofíticos produziram diversos metabólitos bioativos, e dentre eles a brefeldina A que já foi produzida por diversas espécies de fungos dos gêneros *Alternaria*, *Ascochyta*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Cercospora* e *Phyllosticta*, mas pela primeira vez foi isolada de *Paecilomyces* sp. e *Aspergillus clavatus*.

Um agente imunodepressivo, denominado subglutinol, foi produzido a partir do fungo endofítico *Fusarium subglutinans* isolado da planta medicinal *Tripterigium wilfordii* Hook. F., por Lee (1995). Dessa mesma planta Strobel et al. (1999b) isolaram o fungo endofítico *Cryptosporiopsis quercina* que produziu criptocandina, um antibiótico potente contra *Candida albicans* e *Trichophyton* spp. Criptocandina também foi ativo contra os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*.

Da planta *Artemisia annua* L., utilizada na China devido à atividade antimalárica, Lu (2000) isolou o fungo endofítico *Colletotrichum* sp. a partir da cultura desse endofítico obtiveram três novos metabólitos antimicrobianos.

Guignardia sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii*, isolados de *Spondias mombin* Jacq. (Anacardiaceae) por Rodrigues et al. (2000), produziram metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Das folhas de rizomas de gengibre (*Amomum siamense* Craib), Bussaban (2001) isolou diversos fungos endofíticos, dentre eles os gêneros *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Xylaria* e *Phomopsis*.

Himatanthus sucuuba Wood. é uma planta medicinal da Amazônia, cujo látex é utilizado como agente antitumoral, antiinflamatório, antifúngico, vermífugo e antianêmico. Das folhas e dos segmentos nodais dessa planta foram isolados os fungos endofíticos dos gêneros *Guignardia*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Glomerella*, *Pestalotia* e *Xylaria*

(Magalhães, 2001).

No estudo da diversidade e composição das comunidades de fungos endofíticos, da espécie tropical *Guarea guidonia* (L.) Sleumer, foram isoladas trinta e oito morfoespécies, sendo os gêneros *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Rhizoctonia* os mais abundantes (Gamboa; Bayman, 2001).

Do fungo endofítico *Mycelia sterila*, isolado de *Atropa belladonna* L., foram produzidas três novas preussomerinas, com atividades antibacteriana e antifúngica (Krohn 2001).

Da espécie *Symphytum officinale* L., conhecida popularmente como confrei, Pileggi (2002) isolou fungos endofíticos e os testaram contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados foram excelentes, os microrganismos foram ativos sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*, inibindo seu crescimento.

Das plantas *Aspidosperma tomentosum* Mart. e *Spondias mombin* Jacq., Corrado e Rodrigues (2004) isolaram o fungo endofítico *Phomopsis* sp. e verificaram que os metabólitos secundários produzidos por essa espécie apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

De oitenta e uma plantas medicinais da Tailândia foram isoladas trezentos e sessenta endofíticos. Os extratos de noventa e dois isolados inibiram a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, seis extratos inibiram o *Plasmodium falciparum*, quarenta isolados apresentaram forte atividade contra um vírus causador da herpes e quarenta e oito extratos foram ativos frente a células de câncer de mama (Wiyakrutta, 2004).

Cento e trinta fungos endofíticos foram isolados de doze plantas medicinais tradicionais chinesas, sendo posteriormente testados quanto às atividades antitumorais e antifúngicas. A atividade antitumoral foi exibida por 9,2% dos isolados e 30% dos endofíticos demonstraram atividade antifúngica (Li, 2005).

Das folhas de *Cassia spectabilis* DC., planta utilizada popularmente no Brasil para tratamento de gripes e como laxante, foi isolado o fungo endofítico *Phomopsis cassiae* que produziu dois novos metabólitos. Em experimentos *in vitro* esses compostos foram fortemente ativos contra *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. Além da atividade antifúngica, apresentaram citotoxicidade contra a linhagem celular de tumor cervical humano (Silva, 2005).

Da planta medicinal *Quercus variabilis* Blume, utilizada na China para afecções da garganta, foram isolados 67 fungos endofíticos que foram testados contra fungos e bactérias patogênicos ao homem. Dos isolados, *Cladosporium* sp. mostrou-se mais ativo contra

Aspergillus niger, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis* e *Trichophyton rubrum* (Wang, 2006). Dessa mesma planta, Ge et al. (2008) isolaram um endofítico do gênero *Penicillium* sp., de cuja cultura foram extraídos três alcalóides com propriedades citotóxicas contra algumas linhagens de células cancerígenas.

Silva (2006b) isolou fungos endofíticos *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, planta conhecida vulgarmente como rabo-de-raposa, sendo utilizada na medicina popular contra micoses superficiais. Alguns isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Malassezia furfur* e *M. sympodialis*.

Phongpaichit et al. (2006) estudaram a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas do gênero *Garcinia*, utilizadas na medicina tradicional para tratamento de infecções. Os extratos dos fungos inibiram o crescimento dos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. As espécies isoladas foram representantes dos gêneros *Phomopsis* sp. e *Botryosphaeria* sp.

Tithonia diversifolia A. Gray é uma planta que possui diversas propriedades medicinais, sendo usada no tratamento de malária, diarreia, hepatite e ainda possui propriedades antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana e antiviral. A partir de suas folhas foi isolado o fungo endofítico *Phoma sorghina* de cuja cultura foram extraídos seis compostos: Três antraquinonas conhecidas (1,7-diidroxi-3-metil-9,10-antraquinona, 1,6-diidroxi-3-metil-9,10-antraquinona e 1-hidroxi-3-metil-9,10-antraquinona), uma nova antraquinona (1,7-diidroxi-3-hidroximetil-9,10-antraquinona), e dois novos derivados hexaidroantraquinônicos, dendrióis E e F (Borges e Pupo, 2006).

Tayung e Jha (2006) isolaram 33 fungos endofíticos das cascas da planta medicinal *Taxus baccata* L. Vinte e três isolados foram testados quanto à atividade antimicrobiana. Os extratos de cinco isolados apresentaram alta atividade antimicrobiana, exibindo zonas de inibição de até 24 mm.

De *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob., planta cujas folhas são usadas para preparar chás antidiabéticos, foram isolados trinta e dois fungos endofíticos, quatro foram identificados como: *Papulospora immersa*, *Preussia minima*, *Aspergillus niger* van e *Curvularia lunata* var. *aeria*. Do cultivo dos fungos foram obtidos duzentos extratos, dezessete deles apresentaram alta atividade citotóxica, inibindo a proliferação das células em 75%, sendo considerados fontes promissoras de metabólitos secundários anticancerígenos (Gallo et al., 2007).

De vinte e nove plantas medicinais chinesas foram isolados duzentos e noventa e dois

fungos endofíticos. Os metabólitos presentes nas culturas de alguns endofíticos apresentaram forte atividade antioxidante (Huang et al., 2007).

Da planta medicinal *Thottea grandiflora* Rottb. foi isolado um novo endofítico, sendo denominado *Streptomyces* SUK 06. Os metabólitos secundários extraídos desse fungo demonstraram atividade contra as bactérias patogênicas apresentando diferentes zonas de inibição e exibiram atividade antifúngica com percentual de inibição de até 62% (Ghadin et al., 2008).

Gong e Guo (2009) isolaram 172 fungos endofíticos da planta medicinal *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep. e 128 de *Aquilaria sinensis* Merr. De acordo com as características morfológicas, 58% dos isolados puderam ser identificados, os demais que não esporularam foram agrupados em oito grupos morfológicos. Os endofíticos foram investigados preliminarmente, através de testes de antagonismo utilizando seis microrganismos responsáveis por patologias clínicas. Todos os isolados apresentaram atividade antimicrobiana em relação à *Escherichia coli*. Uma porcentagem maior de endofíticos, isolados de *D. cambodiana* exibiram forte atividade antimicrobiana, em comparação aos isolados de *A. sinensis*, sendo que a zona de inibição variou num raio de 7 à 27 mm. O fungo endofítico *Chaetomium globosum* isolado das folhas da planta medicinal *Ginkgo biloba* L., produziu alguns metabólitos bioativos e dentre estes um novo citotóxico derivado clorado de azafilona denominado caetomugilina D. Todos os compostos produzidos demonstraram uma significativa inibição do crescimento de *Artemia salina* e *Mucor miehei* (Qin et al., 2009).

3.2 Antagonismo entre microrganismos

Os microrganismos com potencial para alterar as funções vitais dos fitopatógenos são considerados antagonistas. Os endofíticos são antagonistas quando ocupam o mesmo nicho ecológico do fitopatógeno, competindo por espaço e por nutrientes dentro da planta, nessa competição ocorre a produção de substâncias tóxicas ao patógeno e de alguma forma podem fazer com que a planta hospedeira desenvolva resistência às doenças (Melo e Azevedo, 1998).

Mariano (1993) cita que os métodos utilizados no processo de seleção de microrganismos antagônicos podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*, onde a maioria dos trabalhos publicados são ensaiados inicialmente em laboratórios, para testar posteriormente *in vivo*, no campo, ou em casa de vegetação, onde todas as condições dos ensaios são

controladas.

Gliocladium e *Trichoderma* spp. demonstraram potencial biocontrole do fitopatógeno *Phytophthora cactorum*, no estudo desenvolvido por Smith et al. (1990).

Na busca de um controle para a doença do trigo (*Triticum aestivum* L.) conhecida por mancha bronzeada, causada pelo fungo *Drechslera tritici-repentis*, Linhares et al. (1995) isolaram cem microrganismos de plantas de trigo e avaliaram o comportamento *in vitro* desses microrganismos contra *Drechslera tritici-repentis*. Os pesquisadores detectaram uma variabilidade na ação dos microrganismos frente aos diferentes isolados do patógeno. Entre os microrganismos testados, 12% apresentaram um controle de 80 a 100% sobre todos os isolados do patógeno *Drechslera tritici-repentis*.

Diferentes testes de antagonismo *in vitro* foram realizados por Martins-Corder e Melo (1998), utilizando *Trichoderma* spp. contra o fungo fitopatogênico *Verticillium dahliae*. Os autores constataram que a maioria dos antagonistas colonizou e produziu esporos em abundância sobre as colônias de *V. dahliae*. Os isolados de *Trichoderma* spp. secretaram metabólitos tóxicos que causaram a degradação das hifas hospedeiras, inibindo o desenvolvimento de *V. dahliae*. No contato íntimo entre as hifas, o antagonista enrolou-se no *V. dahliae*, formando estruturas semelhantes a ganchos, causando a destruição da parede celular, provavelmente para obter nutrientes a partir das células mortas.

Visando avaliar o biocontrole de *Ralstonia solanacearum*, responsável pela murcha bacteriana do tomateiro, Moura e Romeiro (1999) testaram isolados de actinomicetos quanto ao antagonismo *in vitro* em relação aos isolados de *R. solanacearum*. A maioria dos isolados apresentou uma atividade considerada intermediária em relação a inibição do crescimento do fitopatógeno. O isolado que apresentou maior atividade, inibiu 42% dos isolados de *R. solanacearum*.

Na busca por microrganismos com potencial para controle biológico de fitopatógenos, o gênero *Trichoderma* está entre os mais estudados.

Buscando obter formas alternativas de controle da pinta-preta da erva-mate, causada por *Cylindrocladium spathulatum*, Gomes et al. (2001) desenvolveram um estudo cujo objetivo foi selecionar fungos e bactérias antagônicos a *C. spathulatum* *in vitro* e *in vivo*. Os isolados de bactérias e de *Trichoderma* que apresentaram maior percentual de inibição, através da técnica de cultura pareada, com produção de antibióticos e por hiperparasitismo, respectivamente, foram selecionados para serem empregados nos testes subsequentes com papel celofane, placas sobrepostas, inibição de germinação de esporos, antagonismo em folhas destacadas e em mudas.

Buscando o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero, De Marco et al. (2000) utilizaram *Trichoderma harzianum* que demonstrou ser um potente antagonista, através da secreção de enzima que afetou substancialmente a parede celular do fitopatógeno *Crinipellis pernicioso*.

Ethur et al. (2001) selecionaram isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de antagonismo sobre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, um fungo do solo que causa uma doença conhecida como mofo branco. Três isolados cresceram sobre o patógeno, sendo que dois deles tomaram menos de dois terços da placa, mas um deles cresceu e tomou mais de dois terços da placa. O confronto direto entre o antagonista e o patógeno demonstrou que os três isolados utilizaram outras formas de antagonismo, além da antibiose.

Barbosa et al. (2001) avaliaram o antagonismo entre quatro espécies do gênero *Trichoderma* e o fungo *Cladosporium herbarum*, causador de verrugose em maracujá (*Passiflora edulis* Sims). Os resultados demonstraram que três espécies de *Trichoderma* possuem potencial antagonístico para o biocontrole de *C. herbarum*. Mas, *T. koningii* não inibiu o crescimento de *C. herbarum*.

Moreira et al. (2002) selecionaram e avaliaram a eficiência de microrganismos antagonísticos ao fitopatógeno *Monilinia fructicola*, causador da podridão parda nos pessegueiros (*Prunus persicae* (L.) Batsch.). Os fungos isolados dos gêneros *Trichothecium* spp. e *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento do patógeno através da produção de substâncias inibitórias. Os isolados de *Trichoderma* spp. e *Penicillium* sp. cresceram sobre o patógeno. Nos frutos, os antagonistas que exerceram maior controle da doença foram os isolados de *Trichothecium* spp., acima de 80% de controle.

Com o objetivo de isolar *Trichoderma* spp. da região com atividade antagonista contra *Rhizoctonia solani*, Cúndom et al. (2003) desenvolveram experimentos *in vitro* utilizando a técnica de papel celofane e *in vivo*. Verificaram que todos os isolados diminuíram significativamente o crescimento miscelial de *R. solani*, através da produção de compostos não voláteis. No campo os pesquisadores observaram uma redução significativa na manifestação da doença causada por *R. solani* em plântulas de melão (*Cucumis melo* Blanco).

Kupper et al. (2003) estudaram a potencialidade antagonística de isolados de *Bacillus subtilis* a *Colletotrichum acutatum*, responsável pela queda prematura dos frutos cítricos (*Citrus* spp.), *in vitro* e *in vivo*. Os autores avaliaram 64 isolados de *B. subtilis*, quatro isolados de *Bacillus* spp. e um isolado de *B. thuringiensis* quanto à capacidade de inibir o desenvolvimento do fitopatógeno em cultura pareada e quanto à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. Os isolados que inibiram o patógeno foram testados em condições

de campo visando o controle da doença. Todos os isolados de *Bacillus* spp. inibiram o crescimento de *C. acutatum*, *in vitro*, havendo a produção de metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial de *C. acutatum*.

Trichoderma harzianum 650 e *Paenebacillus lentimorbus* 629 foram selecionados para avaliar o controle sobre *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *F. oxysporum* *in vitro*. Os antagonistas foram eficientes no controle desses fitopatógenos (Montealegre et al., 2005).

Ethur et al. (2005), objetivando selecionar antagonistas à *Sclerotinia sclerotiorum* isolaram 112 fungos de quatro gêneros, e testaram esses isolados *in vitro* e *in vivo* contra o fitopatógeno. Destes, 17 isolados do gênero *Trichoderma* foram considerados potencialmente ativos nos testes *in vitro*. Os isolados de *Penicillium* spp. demonstraram uma inibição de 0 a 48% e um isolado apresentou uma inibição de 77%. Os isolados de *Aspergillus* spp. (inibição de 0 a 1,4%) e *Fusarium* spp. (inibição de 0 a 2,4%) não mostraram bons desempenhos quando comparados aos isolados de *Trichoderma* spp. Mesmo demonstrando os melhores resultados, a variabilidade entre isolados de *Trichoderma* foi evidente, pois dos 73 isolados obtidos, oito não apresentaram qualquer inibição no crescimento micelial do fitopatógeno, mas a maior parte dos isolados (89%) apresentou índices variados de inibição micelial de *S. sclerotiorum*.

Rubini et al. (2005) isolaram fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.) com o objetivo de testar o potencial antagônico desses fungos contra o fungo *Crinipellis perniciosa*, causador de uma severa doença em cacauzeiros, conhecida como vassoura-de-bruxa. Através da identificação morfológica e da sequência de rDNA foram identificados como os fungos pertencentes a comunidade endofítica de cacau: *Acremonium* sp., *Blastomyces* sp., *Botryosphaeria* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cordyceps sobolifera*, *Diaporthe phaseolorum*, *D. helianthi*, *Fusarium* sp., *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *F. polyphialidicum*, *Geotrichum* sp., *Gibberella zea*, *G. fujikuroi*, *G. moniliformis*, *Gliocladium* sp., *G. catenulatum*, *Lasioidiplodia theobromae*, *Monilochoetes* sp., *Nectria haematococca*, *Pestalotiopsis microspora*, *Phomopsis* sp., *Pleurotus ostreatus*, *Pseudofusarium purpureum*, *Rhizopycnis vagum*, *Syncephalastrum* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., *V. luteo-album*, *Xylaria* sp. No antagonismo *in vitro*, 16,22% dos isolados inibiram o crescimento do fitopatógeno *Crinipellis perniciosa*. No antagonismo *in vivo*, *Gliocladium catenulatum* reduziu em mais de 70% os sintomas da vassoura-de-bruxa.

No estudo desenvolvido por Melo et al. (2006) uma linhagem de *Aspergillus terreus* demonstrou forte atividade parasítica contra *Sclerotinia sclerotiorum*. As interações entre o

patógeno e o antagonista revelaram que *A. terreus* esporulou profusamente sobre os escleródios. Na microscopia eletrônica de varredura, pode ser visto o antagonista rompendo e lisando a parede celular e penetrando o interior do escleródio, estabelecendo-se no tecido medular do patógeno.

Maki (2006) avaliou o potencial dos fungos endofíticos de cacau como agentes no controle biológico de *Crinipellis pernicioso* e de outros fitopatógenos. Dos 145 isolados avaliados, 38,6% foram considerados como antagonísticos.

Coelho et al. (2007) avaliaram o efeito antagônico de *Pichia ohmeri* 158 contra *Penicillium expansum* e a degradação de patulina, uma micotoxina presente em maçãs, sendo produzida por *P. expansum*, o estudo foi realizado *in vitro*. O sobrenadante do cultivo de *P. ohmeri* 158 inibiu 66,17% do desenvolvimento micelial, de *P. expansum* indicando antibiose relacionada ao fator *killer*. A concentração inicial de patulina (223 mg) na presença de células íntegras de *P. ohmeri* foi reduzida em mais de 83% após dois dias de incubação e superior a 99% após 5 dias, não sendo mais detectada no 15º dia.

Lisboa (2007) avaliou a eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea*, reponsável pelo mofo cinzento em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Utilizando o método de cultura pareada, os autores avaliaram *in vitro* o potencial de controle dos antagonistas. Após os resultados das avaliações *in vitro* foram escolhidos dois isolados, um de *Trichoderma harzianum* e outro de *Gliocladium viride*, para serem testados em condições de ambiente protegido. A pulverização foliar semanal com uma suspensão com 2×10^7 conídios. mL⁻¹ reduziu significativamente a incidência do mofo cinzento, enquanto na aplicação dos antagonistas nas sementes, no substrato e na cova, no momento do plantio, não houve a redução da incidência do patógeno.

Remuska e Pria (2007) avaliaram o efeito antagonista de *Trichoderma* sp. e *Bacillus thuringiensis* contra os fitopatógenos *Sclerotium rolfii*., *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Bipolaris sorokiniana*. A bactéria *B. thuringiensis* mostrou-se eficaz como antagonista inibindo o crescimento da maioria dos fitopatógenos. A inibição de crescimento variou na porcentagem de 39,41 a 7,99 %, para *S.rolfsii* e *B. sorokiniana*, respectivamente. *Trichoderma* sp. exerceu controle significativo apenas sobre *S.rolfsii*, mas não impediu a formação de escleródios.

Martins et al. (2007) estudaram o potencial antagônico de vinte isolados de *Trichoderma* spp. contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo todos os isolados classificados como altamente antagonistas.

Mello et al. (2008) estudaram o antagonismo entre *Dicyma pulvinata* contra *Fusicladium macrosporum*, em folhas de seringueira. *D. pulvinata* invadiu os esporos de *F. macrosporum* desintegrando-os e esvaziando os seus conteúdos, e além disso sobrepôs completamente o patógeno.

Silva et al. (2008) avaliaram a atividade antagônica *in vitro* de fungos *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *Phytophthora citrophthora*. Os isolados *Trichoderma viride*, *T. virens*, *T. harzianu* e *T. stromaticum* demonstraram efeito significativo na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno, sendo que *Trichoderma stromaticum* foi o melhor antagonista, e *T. harzianum* apresentou menor antagonismo.

O potencial antagonista do actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus* contra os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Sclerotium rolfsii* foi testado por Prapagdee et al. (2008). O actinomiceto reduziu o crescimento micelial de ambos patógenos, mas a redução foi maior em *C. gloeosporioides*.

Rocha (2009) selecionou fungos endofíticos da planta medicinal confrei *Symphytum officinale* L. buscando o controle biológico *in vitro* do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Dos doze endofíticos, quatro deles (*Trichophyton* sp., *Chrysosporium* sp., *Candida pseudotropicalis* e *Candida tropicalis*) apresentaram os melhores resultados, exibindo 46,6% a 50% de redução no crescimento micelial do fitopatógeno.

3.3 Produção de substâncias antioxidantes por fungos endofíticos.

Em diversos artigos é discutida a correlação entre a capacidade antioxidante e a presença de compostos fenólicos em muitos extratos de plantas medicinais. No entanto, não há informações disponíveis sobre a relação existente entre a atividade antioxidante de alguns extratos de microrganismos endofíticos e seus metabólitos. Huang et al. (2007) investigaram a relação entre a capacidade antioxidante e a presença de compostos fenólicos em extratos de 292 fungos endofíticos morfologicamente distintos, isolados de 29 plantas da medicina tradicional chinesa. A capacidade antioxidante das culturas de fungos endofíticos foi correlacionada de forma significativa com o conteúdo de compostos fenólicos. Este estudo revelou que os metabólitos produzidos por uma grande diversidade de fungos endofíticos pode ser uma fonte potencial de novos antioxidantes naturais.

Das substâncias já isoladas e devidamente identificadas, a isopestacina, isolada da cultura de *Pestalotiopsis microspora*, associada ao vegetal *Terminalia morobensis*, apresenta atividade antioxidante, possivelmente pela similaridade estrutural com substâncias da classe

dos flavonóides (STROBEL et al., 2002).

4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *ABAREMA COCHLIOCARPOS* (GOMES) BARNEBY & GRIMES E *DALBERGIA ECASTOPHYLLUM* (L.) TAUB.

4.1 Introdução

O isolamento de microrganismos endofíticos pode ser realizado em laboratório desde que seja conduzido de forma cuidadosa para que sejam eliminados os epifíticos. Um dos processos mais comuns de isolamento utiliza a lavagem dos órgãos vegetais em estudo com etanol, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio e finalmente tratamento com etanol ou água esterilizada. Os tempos de tratamento e a concentração do hipoclorito de sódio dependem da textura do material vegetal. A etapa seguinte no isolamento é a transferência dos fragmentos para os meios de cultura apropriados. Para o isolamento de fungos podem ser utilizadas placas de Petri com meios como o Sabouraud, batata-dextrose-ágar (BDA) e outros, muitas vezes acrescidos de algum antibiótico para impedir o crescimento de bactérias (Azevedo, 1998).

Na identificação molecular de um dado fungo em qualquer tipo de amostra é necessário providenciar iniciadores que propiciem a amplificação de um gene ou segmento específico daquela espécie que se deseja identificar. Neste sentido, algumas regiões tais como aquelas que codificam para RNA ribossômico têm sido bastante úteis. O DNA que codifica para RNA ribossômico (rDNA) apresenta-se como um grupo gênico, no qual se tem o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Estes genes são separados por regiões espaçadoras internas denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico. O grupo gênico que codifica para RNAr aparece repetido centena de vezes no genoma fúngico. O fato desse grupo gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos (Fungaro, 2000).

Segundo White et al. (1990), as regiões ITS do rDNA, evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, ao contrário das demais regiões do rDNA, sendo assim, essas regiões são de grande interesse nos estudos filogenéticos em níveis de gênero, espécies e populações.

O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade. Como consequência disso, é

grande o número de seqüências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos (Fungaro, 2000).

Os objetivos deste capítulo são o isolamento de fungos endofíticos a partir de tecidos sadios de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum* e a identificação destes isolados utilizando técnicas moleculares.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Escolha das espécies vegetais e local de coleta

As espécies vegetais *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae-Mimosoideae) e *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Leguminosae-Papilionoideae) foram selecionadas para o isolamento dos fungos endofíticos devido a trabalhos já realizados com extratos das cascas da primeira que é conhecida popularmente na cidade de Maceió-AL como Barbatimão, com conhecido valor etnofarmacológico entre a população e antimicrobiano *in vitro* como mostra Santos et al. (2007), e com a segunda espécie conhecida popularmente por rabo-de-bugio, por ser uma das espécies predominantemente visitadas por abelhas que produzem a própolis vermelha alagoana como (Daugusch et al., 2007).

Os locais de coleta foram selecionados na própria região metropolitana de Maceió que apresentou 89 % de umidade relativa do ar, 24,7 °C de temperatura média. O material vegetal de barbatimão necessário para a condução dos experimentos foi colhido a partir de indivíduos pertencentes à coleção de plantas do Arboretum de Alagoas da UFAL localizado no campus A. C. Simões da Universidade Federal de Alagoas. Já os exemplares de rabo-de-bugio, foram coletados numa área de restinga localizada as margens do complexo lagunar Mundaú-Manguaba. Os dois locais de coleta tiveram suas coordenadas geográficas estabelecidas através de aparelho portátil de sistema de geoprocessamento global Garmin etrex vista Hcx.

Excisas de ambas as espécies vegetais foram feitas e enviadas para o herbário do Instituto do Meio Ambiente (IMA-AL) para identificação. Os números de registro foram MAC34614 para *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e MAC30003 para *D. ecastophyllum* (L.) Taub.

4.2.2 Preparo dos meios de cultura para o isolamento de fungos endofíticos de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e *D. ecastophyllum* (L.) Taub.

Para isolamento dos fungos endofíticos de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e *D. ecastophyllum* (L.) Taub. foram utilizados os meios de cultura Água-Ágar (AA) para a introdução do material vegetal e o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) utilizado para o controle do processo de desinfestação.

A forma de preparo dos meios de cultura foi a seguinte:

- Meio de cultura Água-Ágar (AA)

O meio de cultura foi preparado utilizando-se água destilada acrescido de Agar a 1% (p/v). A mistura foi aquecida até completa dissolução do ágar e vertida em erlenmeyers de 250 mL até o volume equivalente a um terço da capacidade do recipiente que finalmente foi tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de 1Kg.F.cm^{-2} e 121°C de temperatura durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização, foi vertido, em ambiente estéril, um volume de 10 a 30 mL de meio em placas de Petri ou potes do tipo *baby pote* devidamente esterilizados em estufa (170°C por 2 horas) ou autoclave (1Kg.F.cm^{-2} e 121°C de temperatura durante 20 minutos). As placas de Petri ou potes foram vedados com filme plástico após a solidificação do meio e finalmente permaneceram armazenados por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e momentos antes a introdução do material vegetal foram analisadas visualmente quanto a contaminação.

- Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

O meio de cultura foi preparado utilizando-se batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) descascada e cortada em rodela a 20% (p/v), Agar a 1,5% (p/v), glicose a 2% (p/v) e água destilada. A batata foi cozida em béquer com metade do volume final de água destilada por 30 minutos. Em seguida, foi filtrada através de camada dupla de algodão ou papel filtro. A glicose foi adicionada ao líquido filtrado e o volume final da solução completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8, e o ágar foi então acrescido ao meio de cultura para que fosse fundido e homogeneizado. Finalmente, o meio de cultura foi vertido em erlenmeyers de 250 mL até aproximadamente um terço da capacidade do recipiente, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizado em autoclave à pressão de 1Kg.F.cm^{-2} e 121°C durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização o meio foi vertido, em ambiente asséptico, um volume de 10 mL de meio em placas de Petri devidamente esterilizadas em estufa (170°C por 2 horas) ou autoclave ($1\text{KgF}.\text{(cm}^2\text{)}^{-1}$ e 121°C de temperatura durante 20 minutos). As placas de Petri foram vedadas com filme plástico após a solidificação do meio de cultura e então permaneceram armazenadas por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e foram

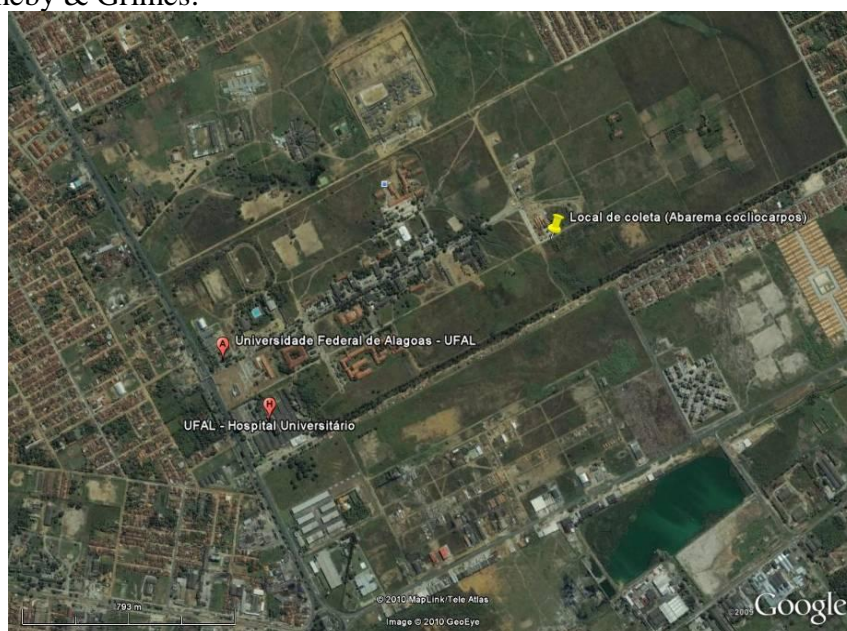
analisadas visualmente quanto a contaminação momentos antes a introdução do material vegetal.

4.2.3 Coleta do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e *D. ecastophyllum* (L.) Taub.

A partir de informações de moradores, foi possível estabelecer os locais de coleta e com o uso de aparelho GPS estes locais tiveram suas coordenadas geográficas demarcadas. Para a espécie vegetal *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes seu local de coleta (Figura 1) foi feito em S 09°33.181' W 035°46.178'. No arboretum da UFAL, os vegetais foram plantados e mantidos para a produção de mudas a partir de sementes. O local de coleta de *D. ecastophyllum* (L.) Taub. foi feita em S 09°40.878' W 035°46.124'. O local selecionado para a coleta de amostras de *D. ecastophyllum* foi uma área de restinga rodeada de construções a margem do complexo lagunar Mundaú-Manguaba. Esta região de restinga se encontra sobre grande pressão antrópica como pode ser observado na Figura 2.

As plantas de *D. ecastophyllum* foram encontradas de forma abundante e de fácil acesso. Os fungos foram isolados a partir de plantas que não demonstravam sintomas de doenças ou injúrias mecânicas causadas por ataque de insetos (Figura 3 e 4).

Figura 1- Imagem de satélite da região onde é localizado o Arboretum da Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, onde foi coletada da espécie *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes.



Fonte: (Autor, 2011)

Figura 2- Imagem de satélite da região de restinga ao lado do complexo lagunar Mundaú-Manguaba local de coleta da espécie *D. ecastophyllum* (L.) Taub.



Fonte: (Autor, 2011)

Figura 3- Árvores da espécie *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes localizadas no Arboretum da UFAL utilizadas para coleta de ramos para o isolamento de fungos endofíticos.



Fonte: (Autor, 2011)

Figura 4- Ramos com flores e frutos de *D. ecastophyllum* (L.) Taub. encontrados na região de restinga localizado ao lado do complexo lagunar Mundaú-Manguaba.



Fonte: (Autor, 2011)

A coleta do material vegetal foi realizada nas primeiras horas da manhã (entre 6 e 7 horas) e foram utilizados sacos de polietileno novos, ferramentas de corte e caixa térmica com gelo. Todo o material utilizado foi limpo com solução de hipoclorito de sódio a 1% (p/v) minutos antes da coleta.

Ramos apresentando folhas saudáveis sem sintomas de doenças ou injúrias mecânicas foram coletados, colocados individualmente em sacos de polietileno e condicionados em caixa térmica resfriada com gelo e logo após, trazidos ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microrganismos Endofíticos onde foram prontamente lavados com água corrente por cerca de uma hora. Depois, todas as folhas foram destacadas e os ramos foram descartados.

As folhas foram, então, devidamente desinfestadas seguindo os seguintes passos:

- 1º) As folhas foram colocadas em bécker, submersas e agitadas em solução de álcool 70% (v/v) por um minuto;
- 2º) Foi retirado o álcool e foram colocadas 10 folhas por frasco de 250 mL com tampa plástica com 100 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 0,20% a 0,25% (p/v) acrescido de duas gotas de detergente comercial. Os frascos foram vedados com filme plástico, agitados

por vinte minutos e;

3º) Em câmara de fluxo laminar, foi retirado totalmente o Hipoclorito de sódio utilizando água destilada estéril (3x).

A eficiência da desinfestação foi comprovada utilizando-se uma alíquota de 100 µL da última água utilizada para retirar o hipoclorito de sódio do material vegetal que foi imediatamente transferida para uma placa contendo o meio BDA. O crescimento de microrganismos nesta placa dias após a desinfestação mostra se o processo foi ou não eficiente.

As folhas desinfestadas foram divididas em segmentos próximos a 1cm² com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e estes foram introduzidos em número de cinco fragmentos por frasco, totalizando vinte frascos contendo meio ágar-água.

Todos os frascos foram observados diariamente. Aqueles que apresentaram sinais do surgimento de estruturas como hifas, eram levados para ambiente estéril e, com alça de platina, eram repicadas para meio BDA.

O meio de cultura BD foi preparado utilizando batata inglesa descascada e cortada em rodela a 20% (p/v) e glicose a 2% (p/v) e água destilada. A batata foi cozida em béquer com metade do volume final de água destilada por 30 minutos. Em seguida, foi filtrada através de camada dupla de algodão ou papel filtro. A glicose foi adicionada ao líquido filtrado e o volume final da solução completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8. Finalmente, 100 mL do meio foi vertido em erlenmeyers de 250 mL, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de 1Kg.F.cm⁻² e 121°C de temperatura durante 20 minutos.

4.2.4 Identificação dos endofíticos através de técnicas moleculares.

- Extração de DNA

O protocolo de Saghai-Marooof et al. (1984) com adaptações, foi utilizado, para a extração de DNA dos fungos endofíticos. Das amostras das colônias fúngicas, com uma semana de cultivo, separou-se com o auxílio de uma pinça esterilizada, cerca de 0,20 g de micélio, sendo colocados em tubos para microcentrifuga de 2,0 mL. Mergulhou-se os tubos em nitrogênio líquido por 5 minutos, e em seguida, o micélio foi macerado com auxílio de uma ponteira para pipeta. Este processo foi repetido mais uma vez.

Logo após, adicionou-se 700 μL de tampão de extração (TE) de DNA (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA e 100 mM NaCl). Posteriormente, foi acrescentado 80 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 1% e 15 μL de Proteinase K (20 mg/mL), e toda a solução foi homogeneizada. Os tubos foram incubados em banho-Maria a 65°C, durante 1 hora. Decorrido esse tempo, acrescentou-se cerca de 10% do volume, equivalente a aproximadamente 88 μL de solução de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) 10%.

Em seguida, a solução foi incubada por mais 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se igual volume de fenol (aproximadamente 850 μL) e homogeneizou-se a solução durante 3 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 14.500 rpm durante 7 minutos. Houve a formação de duas fases, uma fenólica (em baixo) e uma aquosa (em cima). Transferindo-se a fase aquosa para outro tubo de 2 mL.

Foi acrescentado à fase aquosa um volume igual de isopropanol 100%, variando de amostra para amostra, uma vez que cada amostra apresentava sua margem de segurança, resultando em quantidade de fases aquosas diferentes. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 14.500 rpm durante 10 minutos. Depois os tubos foram incubados a 20°C durante 30 minutos, e o isopropanol removido, deixando-se o precipitado.

Os tubos foram invertidos para descartar o excesso de isopropanol. Foi adicionado 600 μL de etanol 70 % e o DNA foi resuspenso. Depois, centrifugaram-se os tubos a 14.500 rpm durante 7 minutos. O etanol foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente por 24 horas. O DNA foi resuspenso em 40 μL de TE. Para certificação do êxito do protocolo de extração de DNA, foi feito gel de agarose 1%, onde se aplicou as amostras.

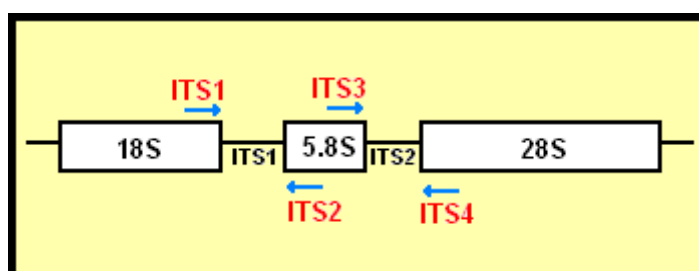
- Amplificação do rDNA

Para análise da variabilidade em fungos, tem sido empregada a amplificação de fragmentos do rDNA, através da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Utilizou-se nesta reação iniciadores específicos, de acordo com White et al. (1990), descritos na Tabela 1. O DNA que codifica para RNA ribossômico apresenta-se como um grupo gênico no qual se tem os genes das subunidades 18S, 5,8S e 28S (Figura 5), esses genes são separados por regiões denominadas ITS. Nesse grupo, os iniciadores ITS1 e ITS2 amplificam a região ITS1 do rDNA, enquanto os iniciadores ITS3 e ITS4 amplificam a região ITS2.

Tabela 1- *Primers* específicos utilizados na reação de PCR para amplificação do rDNA.

Primer	Seqüência
ITS1	F: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
ITS2	R: 5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'
ITS3	F: 5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'
ITS4	R: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Figura 5-Modelo do cluster gênico que codifica para RNA ribossômico



Fonte: (Kamei, 2008).

Para otimizar a PCR em relação à sensibilidade e especificidade, foi empregada a técnica de *nested*-PCR, de acordo com Miyazaki et al. (1993). Primeiramente foi amplificada toda a região ITS, utilizando-se os iniciadores ITS1 e ITS4. Em seguida sob o produto desta reação, com a amostra de DNA diluída em tampão TE na concentração de 10^{-1} , realizou-se a segunda PCR, visando as regiões-alvo. As regiões ITS1 e ITS2 foram amplificadas utilizando-se os iniciadores, ITS1 e ITS2, e ITS3 e ITS4, respectivamente, conforme anteriormente descrito.

As reações apresentaram um volume final de 25 μ L, onde os reagentes e as concentrações de iniciadores que foram utilizados estão descritos na Tabela 2. Os microtubos contendo as reações foram submetidos ao termociclador TC-412 (Techne), na seguinte seqüência: desnaturação inicial (94°C por 5 minutos), seguida de 35 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (94°C durante 1 minuto), uma etapa de anelamento (59°C durante 1 minuto) e uma etapa de extensão (72°C durante 1 minuto), seguida de uma etapa de extensão final de 72°C durante 5 minutos.

Tabela 2-Condições para amplificação mostrando os reagentes constituintes da reação de PCR.

Reagentes	Volume / reação
Tampão Universal (1,5 Mm MgCl ₂ e 0,2 mM dNTP's)	5,0 µL
Primer 1 (10 pmol/µL)	2,0 µL
Primer 2 (10 pmol/µL)	2,0 µL
Taq Polimerase (1U/0,2 µL)	0,2 µL*
DNA	1,0 µL
H ₂ O Mili-Q	10,0 µL
Volume final	25,00 µL

*O volume de Taq Polimerase não é considerado no volume final da reação.

- Purificação dos produtos da PCR

Posterior a amplificação das regiões-alvo, as amostras foram purificadas com isopropanol 65% para a precipitação do DNA. Nesta reação, foram utilizados 20 µL de produtos da PCR, dispostos individualmente em tubos de 1,5 mL para microcentrífuga. Em cada tubo foram acrescentados 72 µL de isopropanol 65%. Homogeneizou-se vigorosamente a mistura e, logo após, os tubos permaneceram em repouso à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Decorrido esse tempo, centrifugou-se as amostras a 14.500 rpm durante 15 minutos.

Em seguida, descartou-se o isopropanol invertendo-se os tubos. Foram adicionados 250 µL de etanol 60% e homogeneizou-se a mistura. Centrifugaram-se os tubos a 14.500 rpm durante 5 minutos. Descartou-se o etanol da solução, usando uma pipeta. Os tubos foram colocados para secar à temperatura ambiente até o dia seguinte. O DNA precipitado foi ressuspendido em 20 µL de tampão TE.

O processo de purificação é um procedimento necessário para retirar o excesso de iniciadores e dNTP's dos produtos de PCR. Esse excesso de iniciadores pode competir com os reagentes da reação de seqüenciamento através de sítios de ligação do DNA. E as elevadas quantidades de dNTP's podem afetar o balanço da reação de seqüenciamento (Applied Biosystems, 2000).

- Reação para seqüenciamento

Foi utilizado nesta reação o Kit BigDyeTM Terminator v3.1 (APPLIED

BIOSYSTEMS, 2002). A reação base de seqüenciamento consistiu em um volume final de 10 μL , onde os reagentes utilizados constam na Tabela 3. As reações foram submetidas ao termociclador em uma seqüência de 25 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação (96°C durante 10 segundos), uma etapa de anelamento (50°C durante 5 segundos) e uma etapa de extensão (60°C durante 4 minutos).

Tabela 3- Reagentes utilizados na reação para seqüenciamento com suas respectivas quantidades.

Reagentes	Volume / reação
Big Dye Mix	2 μL
Sequencing Buffer 2,5X (Tampão Save \$\$)	2 μL
Primer (2,5 pmol/ μL)	1 μL
Taq Polimerase (1U/0,2 μL)	0,2 μL *
DNA	1 μL
H2O Mili-Q	4 μL
Volume final	10,00 μL

*O volume de Taq Polimerase não é considerado no volume final da reação

- Purificação dos produtos da reação de seqüenciamento

Após a reação de seqüenciamento, purificou-se o produto da reação. Utilizou-se o mesmo protocolo de precipitação, descrito anteriormente, com isopropanol a 65%, com uma modificação para a ressuspensão do precipitado, sendo que ao invés de 20 μL de TE, foram utilizados 25 μL de formamida Hi-Di.

A purificação nesta etapa é necessária, uma vez que os corantes fluorescentes, não incorporados aos produtos da reação, podem alterar a qualidade do seqüenciamento. O excesso de corantes formam picos que podem obscurecer porções do eletroferograma gerado pelo *software*, resultando na formação de picos incorretos (Applied Biosystems, 2002).

- Seqüenciamento e análise dos dados

Realizou-se o seqüenciamento dos fragmentos ITS1 e ITS2, mediante eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer, utilizando o polímero POP6 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2000), de acordo com as recomendações do fabricante.

Depois da eletroforese, os dados gerados pelo *software* 310 Data Collection v3.0.0 foram analisados e alinhados, respectivamente pelos programas “Sequencing Analysis v5.2” e “SeqScape v2.5”, ambos da Applied Biosystems. Logo após, foram analisadas as seqüências consenso de cada fungo, através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) das bases de dados da página do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

O programa BLAST utiliza o método de algoritmo de máxima subsequência, no qual há a comparação da percentagem de similaridade genética entre uma seqüência de nucleotídeos em estudo, com uma base de dados de seqüências de nucleotídios disponíveis no banco de genes do NCBI.

4.2.5 Manutenção dos fungos isolados de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e *D. ecastophyllum* (L.) Taub.

Todos os fungos isolados a partir das duas espécies vegetais foram mantidos em placas de Petri contendo meio BDA lacradas com filme plástico e mantidas nas bancadas ou prateleiras em temperatura e iluminação ambiente no laboratório. As repicagens dos fungos foram realizadas em triplicata a cada 2 meses em ambiente estéril.

A manutenção dos isolados foi realizado também através da introdução de 5 discos de 0,6 cm de diâmetro retirados de culturas recentes, com 5 a 7 dias, em frascos do tipo *penicilina* com tampas de borracha contendo 10 mL de água destilada. Os frascos e a água destilada foram esterilizados em autoclave à pressão de 1KgF.cm⁻² e 121°C de temperatura durante 20 minutos. Todos os frascos foram identificados e datados e mantidos em caixas tampadas à temperatura ambiente no laboratório. As repicagens dos fungos foram realizadas em triplicata a cada 6 meses em ambiente estéril.

A eficiência dos 2 métodos de manutenção dos fungos foi realizada de forma visual, tendo em vista que, o crescimento micelial de cada isolado em uma nova placa de Petri com meio BDA, neste trabalho, foi considerado como eficiente.

4.3 Resultados e Discussão

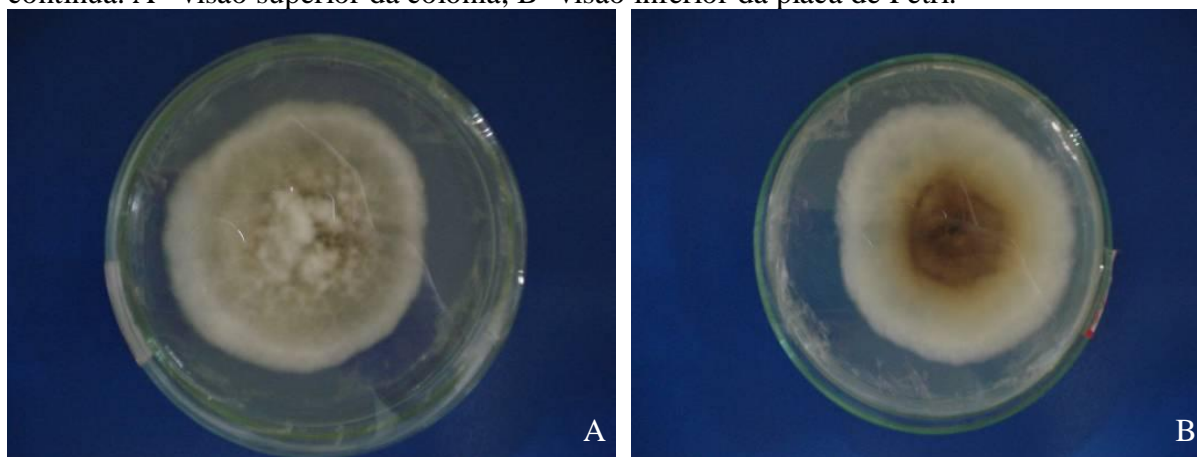
Após sucessivas repicagens em meio de cultura BDA com a finalidade de purificar os fungos endofíticos foi possível obter colônias fúngicas com o aspecto em que se encontram nas Figura 6, 7 e 8.

Os fungos isolados neste trabalho receberam um código de identificação que foi feito levando em consideração a espécie vegetal em que o fungo foi isolado. Para os fungos isolados a partir de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes foram utilizados os códigos AcF1, AcF2 e AcF3, já para os fungos isolados a partir de *D. ecastophyllum* (L.) Taub. foram utilizados os códigos DeF1, DeF2 e DeNs.

Huang et al. (2007) em experimentos utilizando plantas da medicina tradicional chinesa isolaram 1160 fungos endofíticos a partir de 29 plantas, isto mostra que neste experimento houve uma média de 40 isolados de fungos endofíticos a partir de cada hospedeiro.

Sieber (2007) afirma que a diversidade de isolados é geralmente alta mesmo em pequenas quantidades de tecido vegetal e como exemplo mostra que foi possível detectar mais de seis espécies de endofíticos em 1,5 cm² da casca de brotos de castanheira. O número de espécies que podem ser detectadas depende de fatores bióticos, abióticos e experimentais como a espécie hospedeira vegetal experimentada, o tipo e a fase em que se encontra o órgão da planta, condições edáficas e climáticas, o procedimento de isolamento e o número e o tamanho das amostras realizadas.

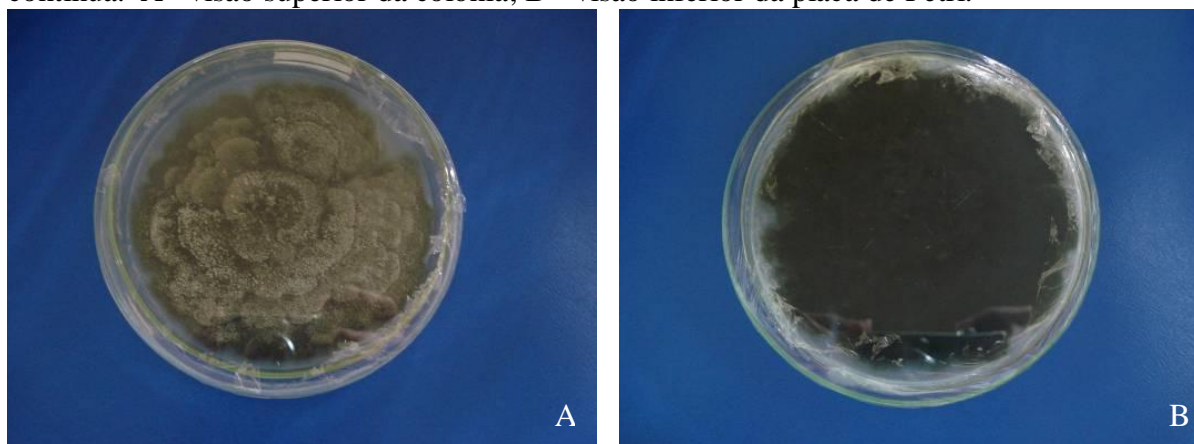
Figura 6- Aspecto da colônia do fungo AcF1 isolado de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a 28±1°C e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B- visão inferior da placa de Petri.



Fonte: (Autor, 2011)

O fungo AcF1 após crescimento *in vitro* em meio de cultura BDA por 7 a 10 dias inicia a liberação de pigmentação alaranjada do centro da placa em direção as bordas corando completamente o meio de cultura.

Figura 7-Aspecto da colônia do fungo AcF2 isolado de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - visão inferior da placa de Petri.

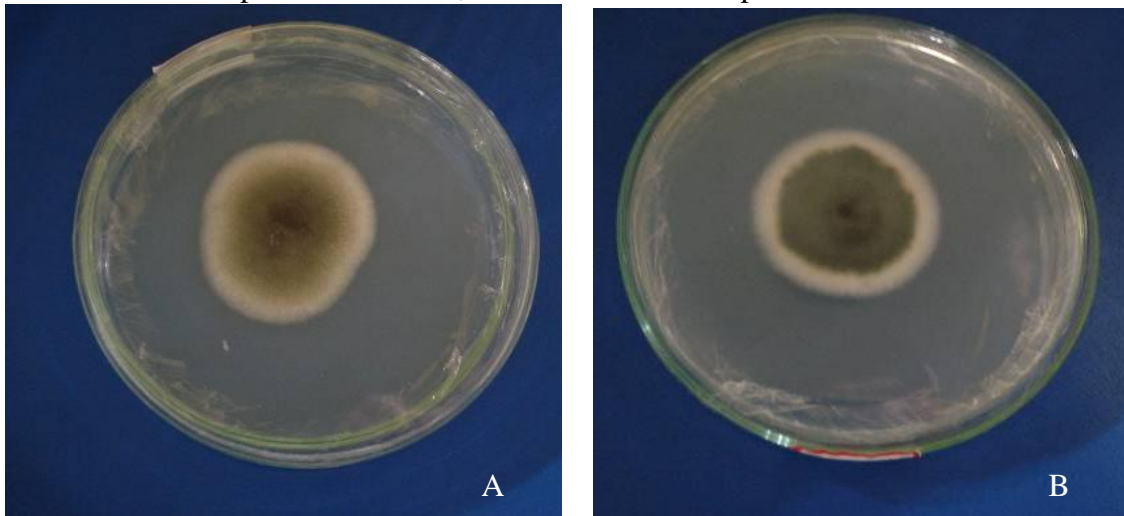


Fonte: (Autor, 2011)

A liberação de pigmentos coloridos por colônias do fungo AcF1 remete ao fato da espécie que foi isolado, a *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes, apresentar em sua casca pigmentação avermelhada que pode ter em sua constituição exsudados deste fungo endofítico. Esta afirmativa tem como base a teoria seguida por Strobel et al. (2004) em que algumas plantas que geram produtos naturais bioativos tem associados endofíticos que produzem os mesmos produtos naturais, como acontece com o fungo *Taxomyces andreanae* isolado de *Taxus brevifolia*, sendo que ambos produzem taxol um diterpenóide utilizado como agente anticancer.

Os fungos AcF2 e AcF3 não mostraram liberação de substâncias pigmentadas *in vitro* no meio de cultura BDA durante todo o período em que foram experimentados neste trabalho como é possível observar nas figuras 7 e 8.

Figura 8- Aspecto da colônia do fungo AcF3 isolado de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - visão inferior da placa de Petri.

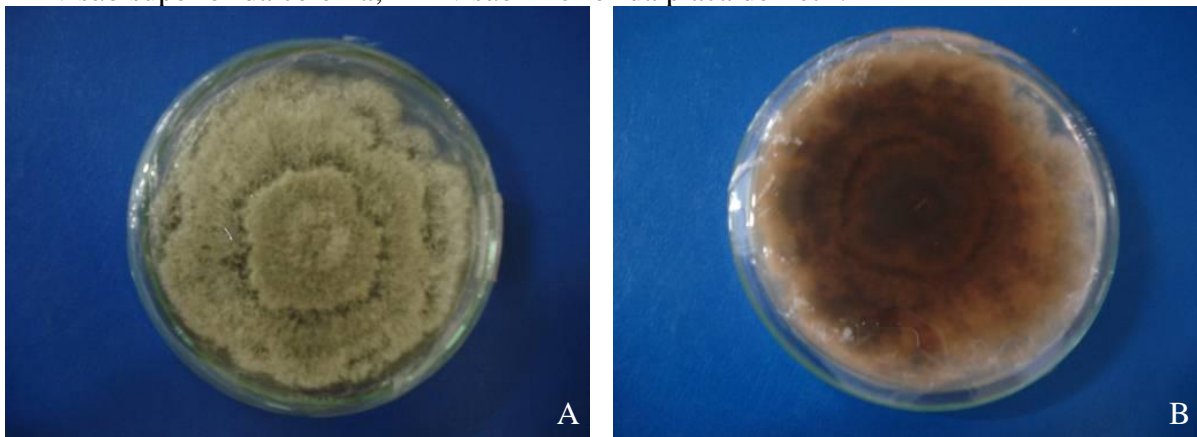


Fonte: (Autor, 2011)

O fungo AcF3 dentre todos os fungos experimentados foi aquele que apresentou o crescimento em placa de Petri mais lento, não chegando muitas vezes a alcançar a borda da placa em períodos superiores a 20 dias.

Após o processo de purificação dos fungos endofíticos isolados de *D. ecastophyllum* (L.) Taub., foi possível obter colônias com as características mostradas nas figuras 9, 10 e 11 quando crescidas em meio de cultura BDA.

Figura 9-Aspecto da colônia do fungo DeF1 isolado de *D. ecastophyllum* (L.) Taub. crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - visão inferior da placa de Petri.

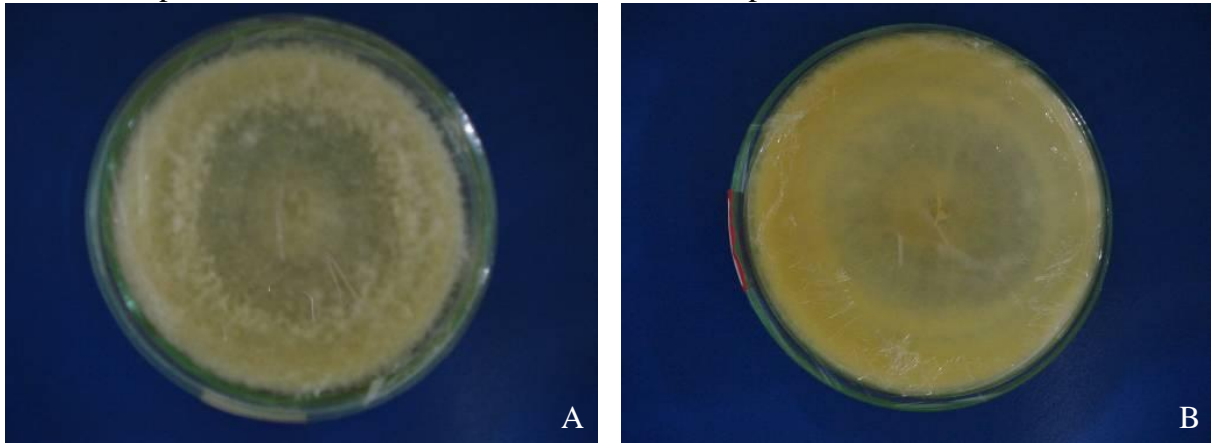


Fonte: (Autor, 2011)

O fungo DeF1 também mostrou liberação de pigmentos alaranjados do centro da placa

em direção aos bordos, pigmentando todo o meio de cultura de forma semelhante ao que aconteceu com o fungo AcF1.

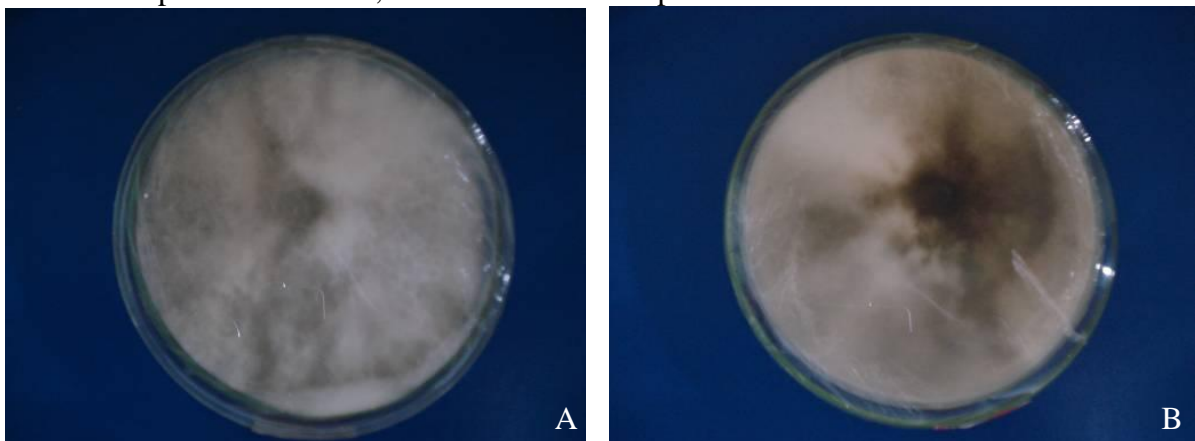
Figura 10- Aspecto da colônia do fungo DeF2 isolado de *D. ecastophyllum* (L.) Taub. crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - direita visão inferior da placa de Petri.



Fonte: (Autor, 2011)

Os Fungos DeF2 e DeNs também liberam pigmentos no meio de cultura, mas a coloração foi diferente sendo um amarelo mais claro no DeF2 como visto na figura 10 e no fungo DeNs foi uma coloração rosada muito pouco perceptível na figura 11.

Figura 11-Aspecto da colônia do fungo DeNs isolado de *D. ecastophyllum* (L.) Taub. crescendo em meio de cultura BDA após 7 dias de incubação a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação contínua. A - visão superior da colônia; B - visão inferior da placa de Petri.



Fonte: (Autor, 2011)

A impossibilidade de identificação de fungos endofíticos por métodos baseados na morfologia diversas vezes é real, já que, frequentemente, isolados permanecem estéreis e

quando ocorre esporulação várias vezes só é possível a identificação do gênero porque as espécies ou não foram descritas ainda ou as estruturas de reprodução diferem significativamente daquelas produzidas no hospedeiro (Sieber, 2007). Contudo, muitos fungos ocorrem como endofíticos em uma ampla gama de hospedeiros, mas só esporulando em somente um ou em poucos deles (Baayen et al., 2002).

A partir do rDNA dos fungos endofíticos isolados foi possível obter sequências de nucleotídeos que foram submetidas ao programa *BLASTn* do *NCBI*, que permitiu a comparação percentual de similaridade encontrada com os dados disponíveis no *NCBI*. As sequências obtidas apresentaram entre 522 a 623 nucleotídeos. Não foi possível sequenciar o rDNA do Fungo endofítico DeF2.

O fragmento das regiões ITS do isolado fúngico AcF1 apresentou 581 nucleotídeos dispostos da forma a seguir:

```
5'TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTGCTGGAACGCGCTTCGGCGCACCCA
GAAACCCTTTGTGAACTTATACCTATCTGTTGCCTCGGCGCAGGCCGGCCTTTTGT
GACAAAGGCCCCCTGGAAACAGGGAGCAGCCCGCCGGCGGCCAACTAAACTCTT
GTTTCTATAGTGAATCTCTGAGTAAAAACATAAATGAATCAAACTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTAT
TCCGGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGAT
GGGGCACTGCTCTTGTTACGAGAGCAGGCCCTGAAATTCAGTGGCGAGCTCGCCA
GGACCCCGAGCGTAGTAGTTATATCTCGCTTTGGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCC
GTAAACCCCAACTTCTGAAAATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG
AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG3'
```

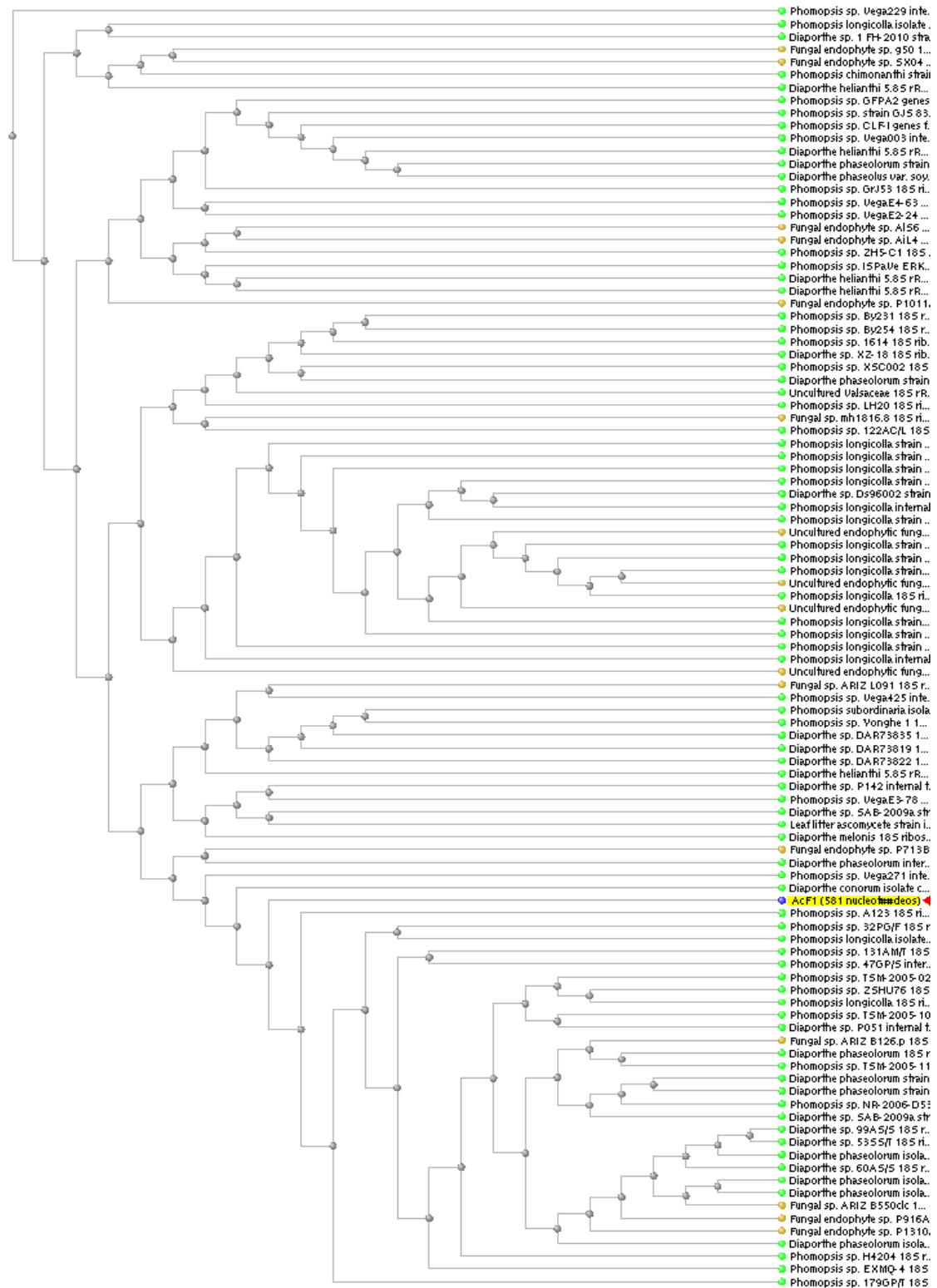
Para o rDNA do fungo endofítico AcF1, foi possível confeccionar a tabela 4, com as 10 seqüências com as maiores porcentagens de identidade com seqüências do *GenBank*, e a árvore dicotômica da figura 12. Com base nessas seqüências e na constituição da árvore dicotômica, o fungo endofítico de código AcF1 pertence ao gênero *Phomopsis* (Tabela 4).

Tabela 4-Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo AcF1.

Organismo	Identidade (%) com seqüência do GenBank	Número de acesso ¹
<i>Phomopsis</i> sp. 131AM/T	98	GU066693.1
<i>Phomopsis</i> sp. 179GP/T	98	GQ352484.1
<i>Phomopsis</i> sp. EXMQ-4	97	FJ233186.1
<i>Phomopsis longicolla</i> strain cn-1	97	EU650789.1
<i>Phomopsis longicolla</i> strain P16	97	EF026104.1
<i>Phomopsis longicolla</i> 113-1	97	AF000207.1
<i>Phomopsis longicolla</i>	97	AY857868.1
<i>Phomopsis longicolla</i> strain Ho101	97	AF000211.1
<i>Phomopsis longicolla</i> strain 628II	97	AF000210.1
<i>Phomopsis longicolla</i> strain 3114-3	97	AF000209.1

¹Número de acesso no GenBank - National Center of Biotechnology Information (NCBI) (site:www.ncbi.nlm.nih.gov).

Figura 12 – Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico AcF1 de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes.



Fonte: (Autor, 2011)

O gênero *Phomopsis* pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotin, classe

Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Diaporthales, família Valsaceae. Apresenta-se na forma anamórfica, o seu teleomorfo é o *Diaporthe* cujo habitat é o caule de plantas lenhosas e herbáceas (HANLIN e MENEZES, 1996).

Foram descritas mais de 1000 espécies do gênero *Phomopsis* baseado principalmente na associação com o hospedeiro (UECKER, 1988). Embora o hospedeiro seja, atualmente, considerado menos importante na definição de espécies, nenhuma revisão do gênero foi realizada. A fase teleomórfica (*Diaporthe*) foi descrita apenas para aproximadamente 20% das espécies do gênero *Phomopsis* (PHILLIPS, 2006). Essa ausência da fase teleomórfica (*Diaporthe*) em meio de cultura (principalmente quando isolado endofiticamente), torna a identificação ao nível de espécie neste gênero muito difícil (REHNER e UECKER 1994).

O fragmento das regiões ITS do isolado fúngico AcF2 apresentou 623 nucleotídeos dispostos da forma a seguir:

```
5'GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATGTAATAACTTCTATTGAAAGG
TTCCAGAGTAGGCGCTACAACGCCGAAATGACCTTCTCACCTTGTGTACTCACTA
TGTTGCTTTGGCGGGTCGACCTGGTTCGGACCCAGGCGGCCGCGCCCCAGCCT
TAACTGGCCAGGACGCCCCGGCTAAGTGCCCGCCAGTATACAAAACCTCAAGAATTC
ATTTTGTGAAGTCCTGATATATCATTTAATTGATTAAAACCTTCAACAACGGATCTCT
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCTGGAG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCAAC
GTCCGCTGCCGGACGTGCCTTGAAGACCTCGGCGACGGCGTCCTAGCCTCGAGCG
TAGTAGTAAAATACTCTCGCTTTGGAGTGCTGGGCGACGGCCGCGGACAATCGACC
TTCGGTCTATTTTCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA
AGCATATC3'
```

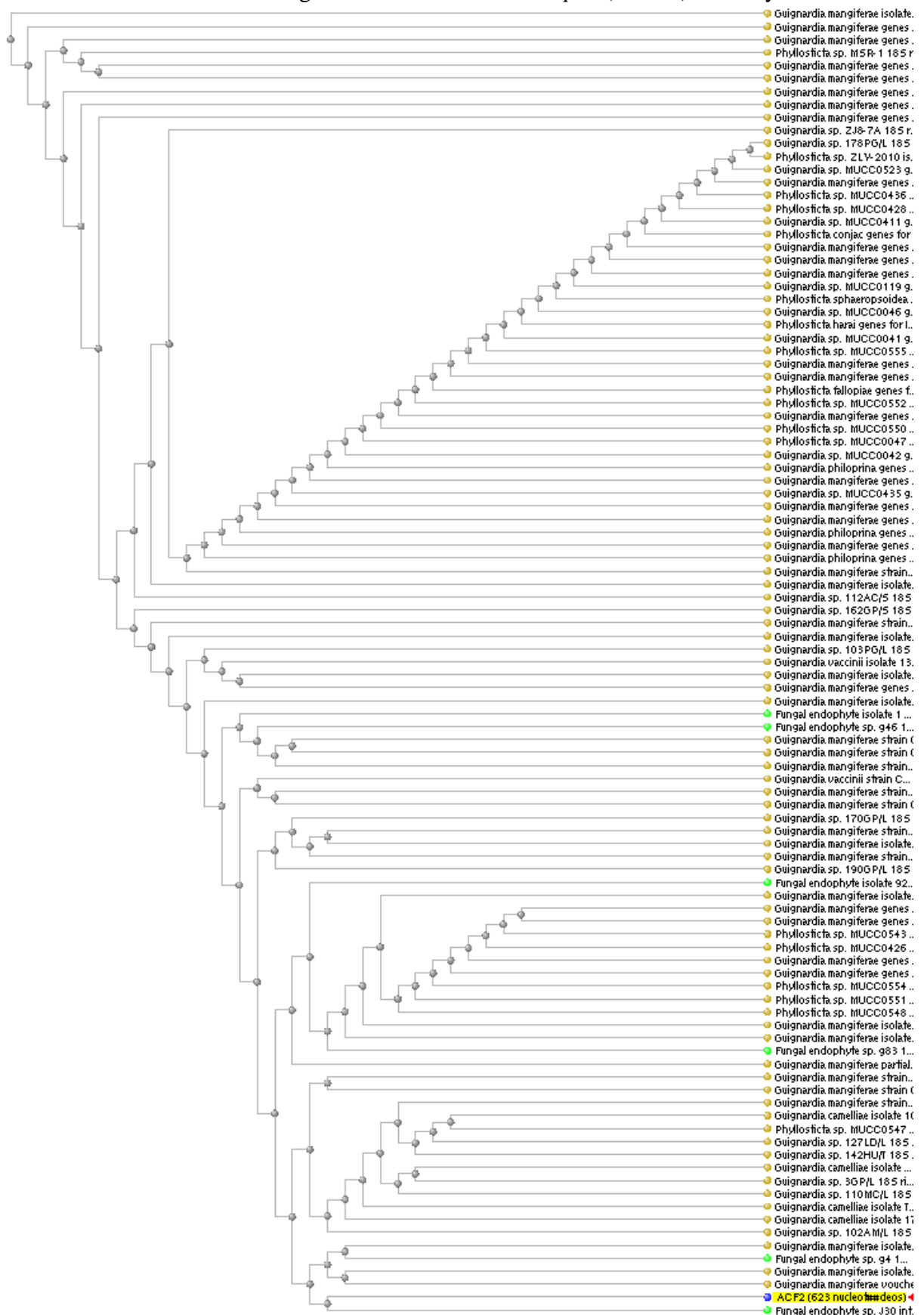
O rDNA do fungo endofítico AcF2 foi possível confeccionar a tabela 5 com as 10 seqüências com as maiores porcentagens de identidade com seqüências do GenBank.e a árvore dicotômica da figura 13. Com base nessas seqüências e na constituição da árvore dicotômica, o fungo endofítico de código AcF2 pertence ao gênero *Guignardia* (Tabela 5).

Tabela 5- Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo AcF2.

Organismo	Identidade (%) com seqüência do GenBank	Número de acesso ¹
<i>Guignardia vaccinii</i> isolado 130CL/L	99	GU066692.1
<i>Guignardia</i> sp. 103PG/L	99	GU066670.1
<i>Guignardia</i> sp. 102AM/L	99	GU066669.1
<i>Guignardia</i> sp. 190GP/L	99	GQ352497.1
<i>Guignardia mangiferae</i> isolado phy06	99	EU821361.1
<i>Guignardia mangiferae</i> isolado phy03	99	EU821358.1
<i>Guignardia mangiferae</i> isolado phy01	99	EU821356.1
Fungal endophyte isolado 1	99	EU686803.1
<i>Guignardia vaccinii</i> strain CBS 114751	99	EU167584.1
<i>Guignardia mangiferae</i> isolado XSD-43	99	EU273524.1

¹Número de acesso no GenBank - National Center of Biotechnology Information (NCBI) (site:www.ncbi.nlm.nih.gov).

Figura 13 - Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico AcF2 de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes.



Fonte: (Autor, 2011)

O gênero *Guignardia* que segundo Sivanesan (1984) foi descrito em 1982 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomorfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos imperfeitos. Dentro do gênero *Guignardia*, uma espécie estudada no Brasil é *G. citricarpa*, que é um ascomiceto, da ordem Dothideales e família Dothideacea.

Espécies de *Guignardia* e/ou seus gêneros anamórficos *Phyllosticta* foram freqüentemente isolados como endófitos produtores de substâncias com alguma propriedade. O mais abundante, o phyllosinol contém uma porção de cetona alfa-beta não saturado com atividade antibacteriana (RODRIGUES-HEERKLOTZ et al., 2001).

No Brasil, o gênero *Guignardia* (*Phyllosticta*) já foi isolado como endófito de citros (GLIENKE-BLANCO et al., 2002), *Mangiferae indica* L, conhecida como manga (STRINGARI, 2004), *Ilex paraguarienses*, conhecida como erva-mate (PENNA, 2000), *Spondias mombin*, conhecido como cajazeiro (RODRIGUES-HEERKLOTZ et al., 2001) entre outros. Há uma grande dificuldade na identificação de espécies deste gênero principalmente utilizando-se apenas características morfológicas (STRINGARI, 2004).

O fragmento das regiões ITS do isolado fúngico AcF3 apresentou 522 nucleotídeos dispostos da forma a seguir:

```
5'CTGCGGAAGGATCATTacTGTGGGCCTTCTTCGGAAGCCCGCAAGATAGCACCCCT
TTGCCTTTTTGAGTACCTTTGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGGGACCTAT
ACAACCCTTTGCAGTAGTATAACAAACGTCTGATACACTTTAATTATCACAACCTTTC
AACAAATGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCT
TTGGTATTCCATAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGCACCCTCAAGCCTTGCTT
GGTGTGGGCGCTTGTCCCGCCGTCGCGCGCGGACTCGCCTGAAATGAATTGGCA
GCCAGCCGCCTGGGCTCGGAGCGCAGCAGAATCAGCGCAGCGAGACCCGGCGYC
GCGGCGTCCACAAGCCCCTTTTTACCACGCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC
CGCTGAACTTAAGCATATC3'
```

O rDNA do fungo endofítico AcF3 foi possível confeccionar a tabela 6 com as 10 seqüências com as maiores porcentagens de identidade com seqüências do GenBank.e a árvore dicotômica da figura 14. Com base nessas seqüências e na constituição da árvore dicotômica, o fungo endofítico de código AcF3 pertence a ordem Pleosporales (Tabela 6).

A ordem Pleosporales pretence à divisão Ascomycota (TANALA e HARADA, 2003)

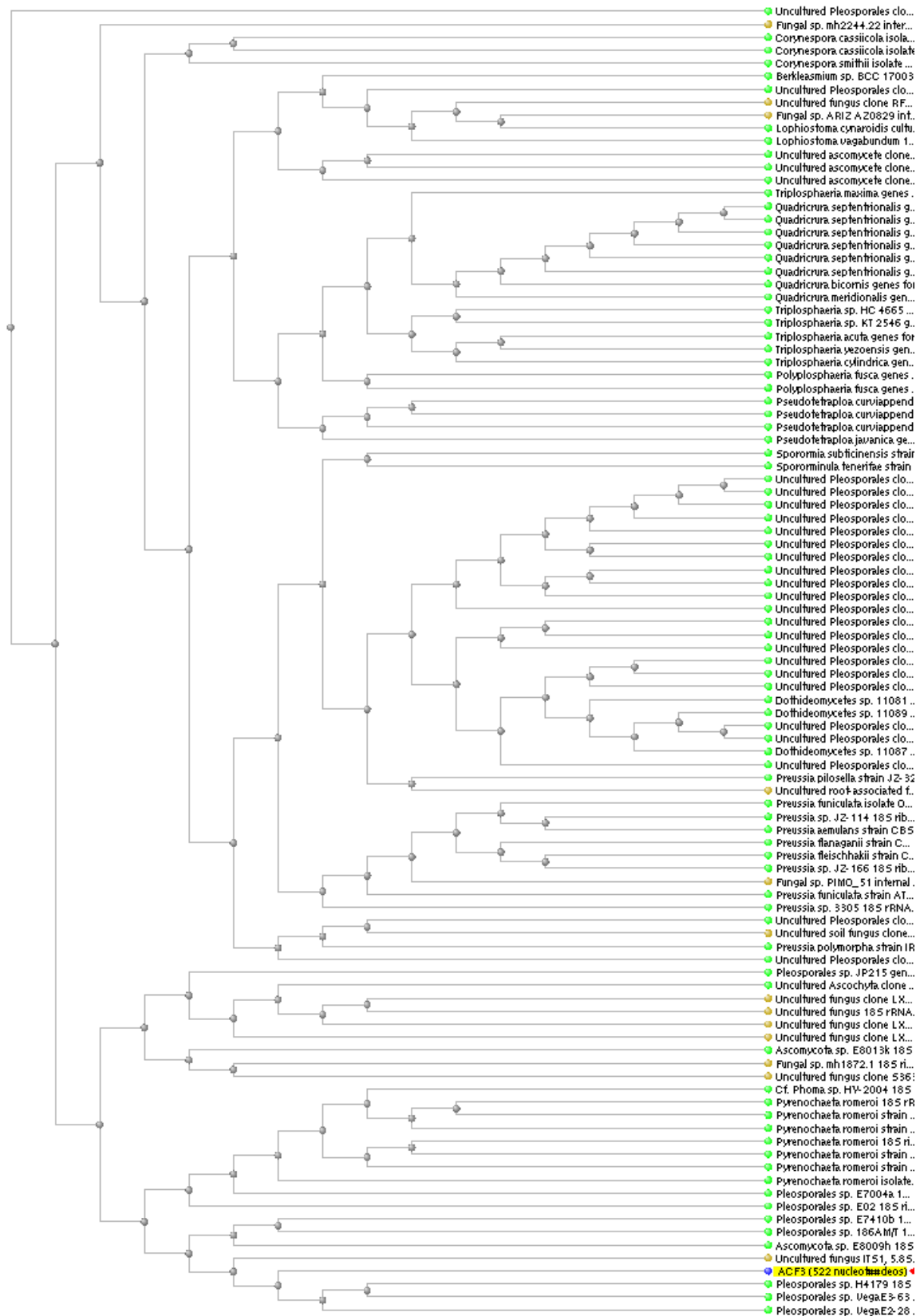
e membros desta ordem podem ser endofíticos ou epifíticos (HUANG et al. 2008, SÁNCHEZ MÁRQUEZ *et al.* 2008, TAO *et al.* 2008), parasitas em folhas verdes ou ramos (WETZEL *et al.* 1999, SOLOMON *et al.* 2006), formando líquens (CALATAYUD *et al.* 2001), saprófitos em folhas mortas ou galhos em ambientes terrestres ou aquáticos (CÂMARA *et al.* 2002, KODSUEB *et al.* 2008, ZHANG *et al.* 2008).

Tabela 6. Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo AcF3.

Organismo	Identidade (%) com	
	seqüência do	Número de acesso ¹
	GenBank	
<i>Pleosporales</i> sp. VegaE2-28	99%	EU002938.1
<i>Pleosporales</i> sp. H4179	99%	GU595025.1
<i>Pleosporales</i> sp. VegaE3-63	99%	EU002939.1
<i>Pleosporales</i> sp. E7410b	90%	HM855221.1
<i>Pleosporales</i> sp. 186AM/T	90%	GU066727.1
Ascomycota sp. E8009h	90%	HQ008912.1
Cf. <i>Phoma</i> sp. HY-2004	88%	AY646226.1
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	88%	FJ528674.1
<i>Pyrenochaeta romeroi</i> strain IP 571.61	88%	DQ836802.1
<i>Pyrenochaeta romeroi</i> strain IP 862.63	88%	DQ836801.1

¹Número de acesso no GenBank - National Center of Biotechnology Information (NCBI) (site:www.ncbi.nlm.nih.gov).

Figura 14- Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico AcF3 de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes.



Fonte: (Autor, 2011)

O fragmento das regiões ITS do isolado fúngico DeF1 apresentou 566 nucleotídeos dispostos da forma a seguir:

5'TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTGCTGGAACGCGCCCCAGGCGCACCC
 AGAAACCCTTTGTGAACTTATACCTTTTGTTCCTCGGCGCATGCTGGCCTCTAGTA
 GGCCCCTCACCCCGGTGAGGAGAAGGCACGCCGGCGGCCAAGTAACTCTTGTTT
 TTACTGAACTCTGAGAAAAACACAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGAT
 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
 TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC
 GGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCATTGCTTGGTGTGGG
 GCACTGCTTTTAACGAAGCAGGCCCTGAAATCTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACCC
 CGAGCGCAGTAGTTAAACCCTCGCTCTGGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTA
 AACCCCAACTTCTGAAAATTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT
 AAGCATATCA3'

O rDNA do fungo endofítico DeF1 foi possível confeccionar a tabela 7 com as 10 seqüências com as maiores porcentagens de identidade com seqüências do GenBank.e a árvore dicotômica da figura 15. Com base nessas seqüências e na constituição da árvore dicotômica, o fungo endofítico de código DeF1 pertence ao gênero *Phomopsis* (Tabela 7).

Espécies de *Phomopsis* são comumente encontradas como patógenos e endófitos de plantas (BODDY e GRIFFITH, 1989). Tradicionalmente o gênero tem sido considerado altamente patogênico (REHNER e UECKER, 1994), mas algumas espécies de *Phomopsis* são, entretanto, endófitos mutualísticos (CARROLL, 1986).

Espécie de *Phomopsis* e *Diaporthe* têm sido, tradicionalmente, descritos com base na espécie hospedeira. Porém, algumas espécies e isolados podem infectar mais de um hospedeiro (BRAYFORD, 1990; FARR et al., 2002), tal estratégia tem sido frequentemente questionada (REHNER e UECKER, 1994). Trabalhos, incluindo estudos de cruzamentos, mostraram que esse critério não é suficiente para classificação ao nível de espécie. Além disso, isolados de *Phomopsis* provenientes do mesmo hospedeiro não necessariamente pertencem à mesma espécie, assim como uma mesma espécie de *Phomopsis* pode infectar diferentes hospedeiros (REHNER e UECKER, 1994).

Foram descritas mais de 1000 espécies do gênero *Phomopsis* baseado principalmente na associação com o hospedeiro (UECKER, 1988). Embora o hospedeiro seja, atualmente, considerado menos importante na definição de espécies, nenhuma revisão do gênero foi

realizada. A fase teleomórfica (*Diaporthe*) foi descrita apenas para aproximadamente 20% das espécies do gênero *Phomopsis* (PHILLIPS, 2006). Essa ausência da fase teleomorfa (*Diaporthe*) em meio de cultura (principalmente quando isolado endofiticamente), torna a identificação ao nível de espécie neste gênero muito difícil (REHNER e UECKER 1994).

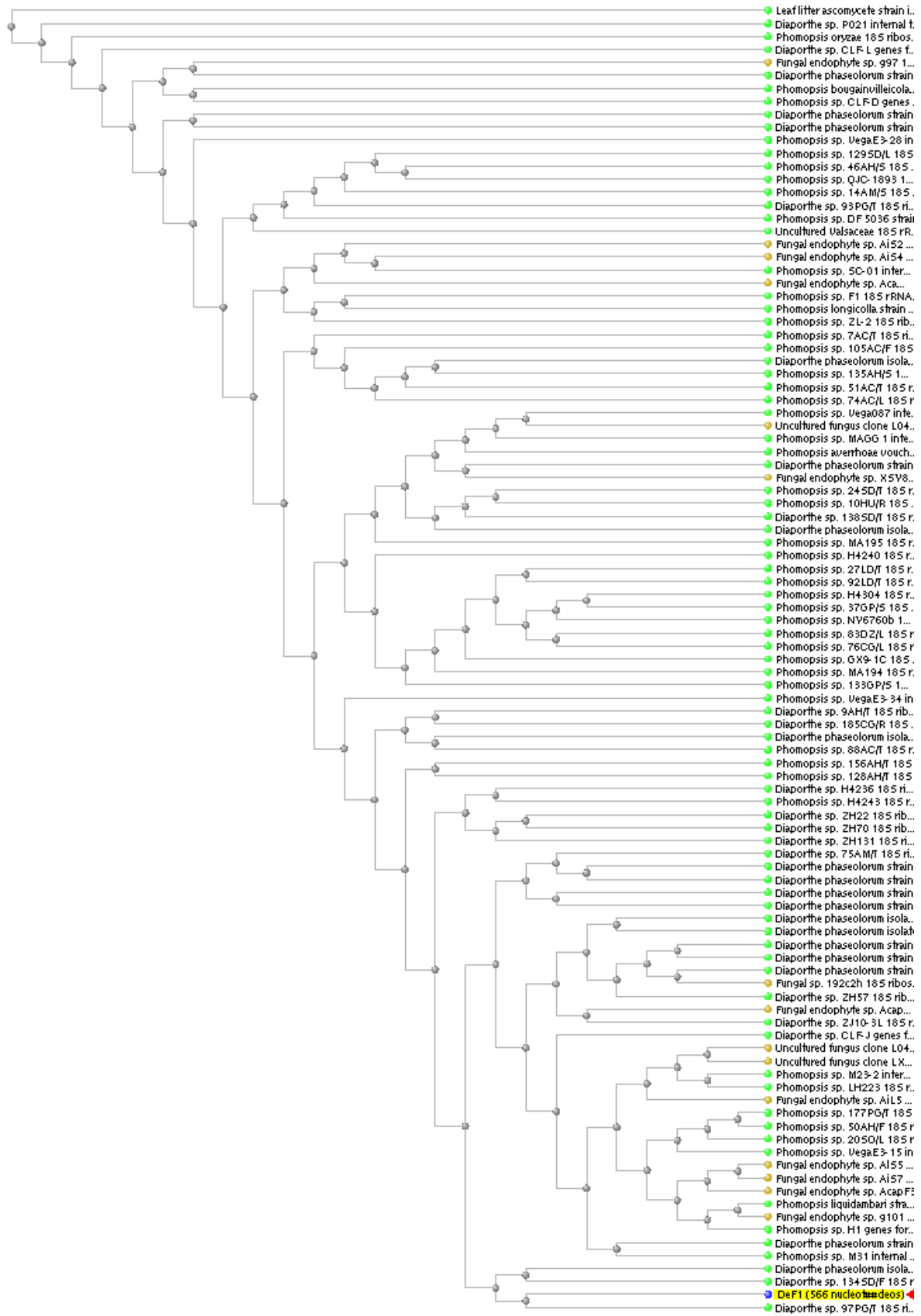
A delimitação de espécies de *Phomopsis* baseado apenas em características morfológicas demonstrou-se inadequada (VAN DER AA, 1990). O entendimento sobre o gênero expandiu-se por meio de estudos de seqüências ITS, nos quais alguns dos isolados agruparam-se por regiões geográficas (REHNER e UECKER, 1994). Alguns trabalhos têm comparado dados morfológicos com dados moleculares, principalmente o uso de seqüências da região ITS do DNA ribossomal. Zhang *et al.* (1998) distinguiu cinco táxons de *Phomopsis* isolados de Soja (*Glycine max*) utilizando seqüências da região ITS do DNA ribossomal, porém não foram capazes de diferenciar-los com base nas características morfológicas.

Tabela 7- Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo DeF1.

Organismo	Identidade (%) com seqüência do GenBank	Número de acesso ¹
<i>Phomopsis</i> sp. 156AH/T	99	GU066708.1
<i>Diaporthe</i> sp. 97PG/T	99	GU066664.1
<i>Phomopsis</i> sp. 128AH/T	99	GU066690.1
<i>Phomopsis</i> sp. 14AM/S	99	GU066607.1
Uncultured Valsaceae	99	AJ877092.1
<i>Diaporthe phaseolorum</i> isolate 123AC/T	99	GU066686.1
<i>Phomopsis</i> sp. 129SD/L	99	GU066691.1
<i>Phomopsis</i> sp. 46AH/S	99	GU066629.1
<i>Diaporthe</i> sp. ZJ10-3L	99	FJ037739.1
<i>Phomopsis</i> sp. VegaE3-28	99	EU002929.1

¹Número de acesso no GenBank - National Center of Biotechnology Information (NCBI) (site:www.ncbi.nlm.nih.gov).

Figura 15 - Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico DeF1 de *D. ecastophyllum*(L.) Taub.



Fonte: (Autor, 2011)

O fragmento das regiões ITS do isolado fúngico DeF1 apresentou 523 nucleotídeos dispostos da forma a seguir:

5'TCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAGAGTTATCCAACCTCCCAAACC
CATGTGAACATATCTCTTTGTTGCCTCGGCGCAAGCTACCCGGGACCTCGCGCCCC
GGGCGGCCCGCCGGCGGACAAACCAAACCTCTGTTATCTTCGTTGATTATCTGAGTG
TCTTATTTAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATTTCAACCCCTAAGCACAGCTTATTGTTGGGCGTCTACGTCTGTAGTGCCTCAA
AGACATTGGCGGAGCGGCAGCAGTCCTCTGAGCGTAGTAATTCTTTATCTCGCTTC
TGTTAGGCGCTGCCCCCGGCGTAAAACCCCAATTTTTTCTGGTTGACCTCGG
ATCAGGTAGGAATACCCG3'

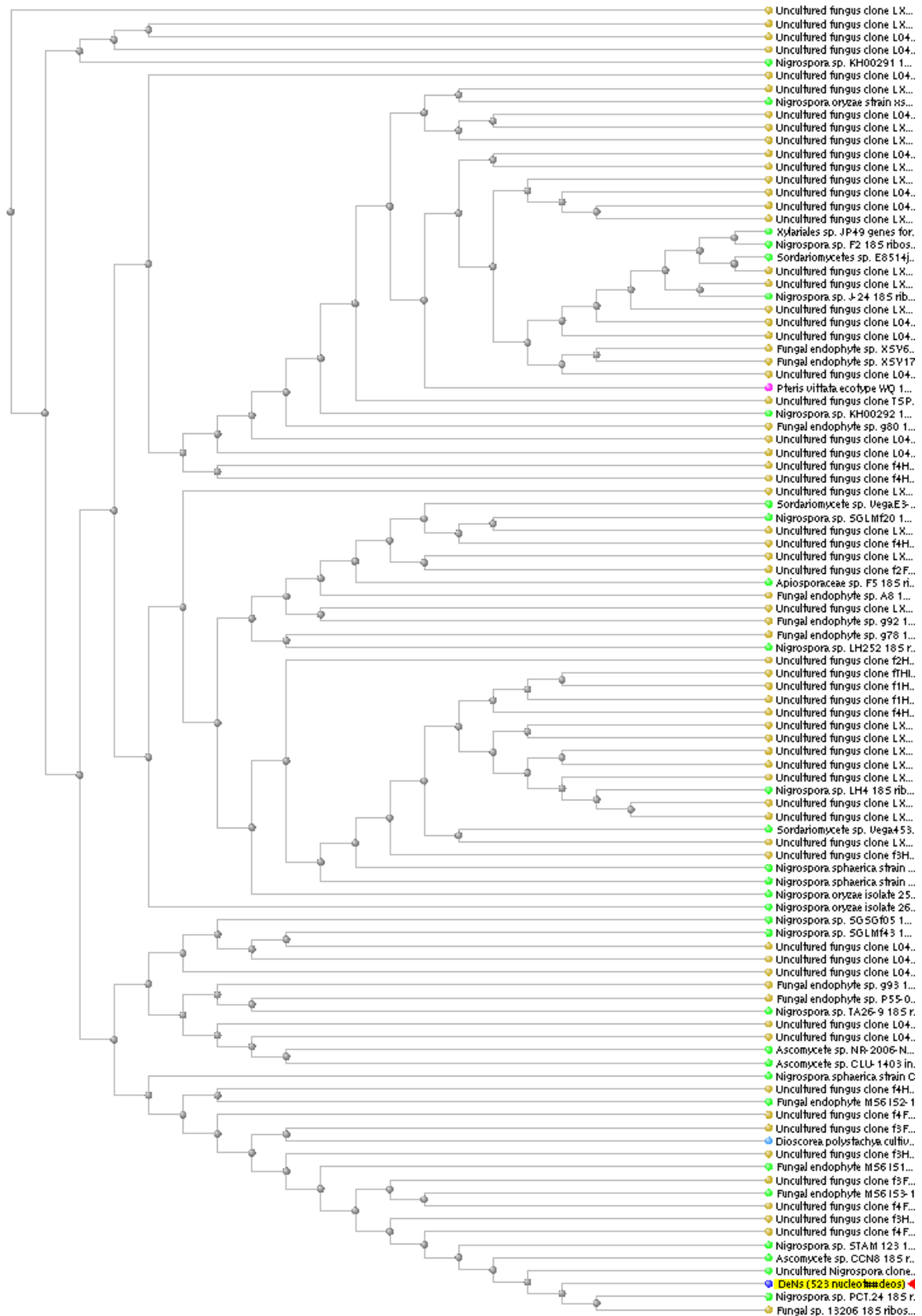
O rDNA do fungo endofítico DeNs foi possível confeccionar a tabela 8 com as 10 seqüências com as maiores porcentagens de identidade com seqüências do GenBank e a árvore dicotômica da figura 16. Com base nessas seqüências e na constituição da árvore dicotômica, o fungo endofítico de código DeNs pertence ao gênero *Nigrospora* (Tabela 8).

Tabela 8-Isolados de fungos utilizados na comparação da similaridade genética com o fungo DeNs, organismo, identidade genética, número de acesso.

Organismo	Identidade (%) com seqüência do GenBank	Número de acesso ¹
<i>Nigrospora</i> sp. STAM 123	100	FJ785429.1
Fungal sp. 13206	99	EF127875.1
Ascomycete sp. CCN8	99	DQ993641.1
<i>Dioscorea polystachya</i> cultivar Tiegunshanyao clone 1	99	FJ860099.1
<i>Nigrospora</i> sp. SGLMf43	99	EU715690.1
<i>Nigrospora sphaerica</i> strain CGMCC 3.10904	99	GQ258792.1
Fungal endophyte MS6 IS133	99	AF413049.1
Fungal endophyte sp. P55-013	99	EU818923.1
<i>Nigrospora</i> sp. SGSGf05	98	EU715641.1
Fungal endophyte MS6 IS2-1	98	AF413047.1

¹Número de acesso no GenBank - National Center of Biotechnology Information (NCBI) (site:www.ncbi.nlm.nih.gov).

Figura 16 - Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico DeNs de *D. ecastophyllum*(L.) Taub.



Fonte: (Autor, 2011)

O fungo *Nigrospora* sp possui uma importante fonte de drogas para o tratamento de diversas patologias. A afidicolina, um metabólito isolado do fungo, que é descrita como tendo ação de inibição da divisão celular por atuar impedindo a função da DNA polimerase, foi testada contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani* (KAYSER et al., 2001). Dentre os 6 fungos endofíticos isolados foi possível obter 2 indivíduos do gênero *Phomopsis* que foram isolados tanto de *A. cochliocarpus* (Gomes) Barneby & Grimes quanto de *D. ecastophyllum* (L.) Taub (Tabela 9).

Tabela 9-Identificação de fungos endofíticos isolados de suas plantas hospedeiras.

Nº	Planta hospedeira	Código do fungo isolado	Ordem/Gênero
1	<i>A. cochliocarpus</i>	AcF1	<i>Phomopsis</i> sp.
2	<i>A. cochliocarpus</i>	AcF2	<i>Guignardia</i> sp.
3	<i>A. cochliocarpus</i>	AcF3	Pleosporales
4	<i>D. ecastophyllum</i>	DeF1	<i>Phomopsis</i> sp.
5	<i>D. ecastophyllum</i>	DeF2	-
6	<i>D. ecastophyllum</i>	DeNs	<i>Nigrospora</i> sp.

Todos os fungos endofíticos experimentados mantidos em água destilada quando repicado em placas de Petri em meio de cultura BDA em intervalo de 6 meses mostraram capacidade de crescimento. E quando mantidos em placas de Petri em meio de cultura BDA e repicados a cada mês também mostraram capacidade de crescimento.

4.4 Conclusão

A partir dos resultados obtidos dos experimentos conclui-se que:

Ocorrem fungos endofíticos em *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum.*, sendo estes identificados através de técnicas moleculares..

5 EFEITO DE CONDIÇÕES ABIÓTICAS IMPOSTAS *IN VITRO* SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *A. COCHLIOCARPOS* E *D. ECASTOPHYLLUM*.

5.1 Introdução

Atualmente, pesquisadores de produtos naturais têm voltado sua atenção para fontes pouco investigadas, como microrganismos marinhos, extremófilos e endofíticos. Associados aos processos de identificação e cultivo destes microrganismos encontram-se novas técnicas de isolamento e identificação, bem como a manipulação das condições de cultivo para obtenção de compostos bioativos (CRAGG e NEWMAN, 2005).

A diversidade de substâncias de interesse isoladas das diversas fontes investigadas pode ser grande mesmo em estudo com fungos obtidos em uma única espécie vegetal, pois se estima que cerca de $1,3 \times 10^6$ endofíticos habitem as mais de 270 mil plantas vasculares conhecidas (BRADY; CLARDY, 2000). Estas espécies existem em ecossistemas e interagem entre si de diversas maneiras e é esperado uma ampla variedade de atividades biológicas (PIMM et al., 1995; VERPOORTE, 1998).

A associação entre os seres vivos é uma condição vital para aquelas espécies incapazes de conseguir por si próprias meios de sobrevivência, incluindo nutrientes e proteção. Entre os microrganismos, os fungos são os que se encontram mais frequentemente associados às plantas. Grande parte das pesquisas com endofíticos têm sido realizada em países do hemisfério norte e Nova Zelândia, sendo os resultados de regiões tropicais menos numerosos e ainda assim, têm mostrado que as plantas tropicais apresentam maior diversidade de microrganismos endofíticos quando comparadas com plantas de clima temperado (SCHULTZ; BOYLE, 2005). Apesar disso, grande parte destes microrganismos ainda não foram identificados e classificados podendo constituir novos gêneros e espécies (AZEVEDO et al. 2000; STROBEL, 2002).

O trabalho com microrganismos tem apresentado vantagens sobre outras espécies, uma delas é a possibilidade de controle sobre os processos operacionais de maneira relativamente simples. Comparando o com as plantas, os fungos naturalmente apresentam crescimento mais rápido e em menor espaço. Além disso, as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura, aeração e etc) podem ser modificados a fim de aumentar ou direcionar a produção de substâncias de interesse (PEARCE, 1997).

Neste contexto, informações sobre requisitos ambientais como tipo de substrato e

iluminação mais adequados ao crescimento de fungos endofíticos *in vitro* precisam ser prontamente disponíveis para que haja produção de biomassa adequada para a realização de experimentos e identificação através de técnicas moleculares.

O objetivo deste capítulo é identificar entre as condições abióticas impostas *in vitro* aos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum* aquelas que propiciam maior crescimento.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Preparação dos meios de cultura utilizados para o experimento sobre o crescimento radial dos fungos endofíticos isolados.

No experimento sobre o crescimento radial dos fungos endofíticos isolados foram utilizados 6 meios de cultura como descrito por Menezes e Silva-Hanlin (1997) e modificados como mostrado a seguir:

- Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

O meio de cultura BDA foi preparado utilizando batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) descascada e cortada em rodela a 20% (p/v), Agar a 1,7% (p/v), glicose a 2% (p/v) e água destilada. A batata foi cozida em bécker com metade do volume final de água destilada por 30 minutos, em seguida foi filtrada através de algodão ou papel filtro. A glicose foi adicionada ao líquido filtrado e o volume final da solução completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8, o ágar foi então acrescido ao meio de cultura para que fosse fundido e homogeneizado. Finalmente, o meio de cultura foi vertido em erlenmeyers de 250 mL até aproximadamente um terço da capacidade do recipiente, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de 1Kg.F.cm⁻² e 121°C de temperatura durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização, o meio foi vertido, em ambiente estéril, um volume de 10 mL de meio de cultura em placas de Petri devidamente esterilizadas em estufa à 170°C por 2 horas ou autoclave à pressão de 1Kg.F.cm⁻² e 121°C durante 20 minutos. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico após a solidificação do meio e então permaneceram armazenadas por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e foram analisadas visualmente quanto a contaminação momentos antes da condução dos experimentos.

- Meio Batata-Sacarose-Ágar (BSA)

O meio de cultura BSA foi preparado utilizando batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) descascada e cortada em rodela a 20% (p/v), Agar a 1,7% (p/v), sacarose a 2% (p/v) e água destilada. A batata foi cozida em bécker com metade do volume final de água destilada

por 30 minutos, em seguida foi filtrada através de algodão ou papel filtro. A sacarose foi adicionada ao líquido filtrado e o volume final da solução completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8, o ágar foi então acrescido para que fosse fundido e homogeneizado ao meio de cultura. Finalmente, o meio de cultura foi vertido em erlenmeyers de 250 mL até aproximadamente um terço da capacidade do recipiente, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de 1Kg.F.cm^{-2} e 121°C durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização, o meio foi vertido, em ambiente estéril, um volume de 10 mL de meio de cultura em placas de Petri devidamente esterilizadas em estufa à 170°C por 2 horas ou autoclave à pressão de 1Kg.F.cm^{-2} e 121°C durante 20 minutos. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico após a solidificação do meio e então permaneceram armazenadas por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e foram analisadas visualmente quanto a contaminação momentos antes da condução dos experimentos.

- Meio Cenoura-Ágar (CA)

O meio de cultura CA foi preparado utilizando cenoura (*Daucus carota* L.) descascada e triturada a 20% (p/v), Agar a 1,7% (p/v) e água destilada. A cenoura triturada foi mergulhada em água destilada durante uma hora e depois a mistura foi fervida durante 5 minutos, em seguida foi filtrada através de algodão ou papel filtro e o volume final da solução foi completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8, o ágar foi então acrescido para que fosse fundido e homogeneizado ao meio de cultura. Finalmente, o meio de cultura foi vertido em erlenmeyers de 250 mL até aproximadamente um terço da capacidade do recipiente, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de 1Kg.F.cm^{-2} e 121°C durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização, o meio foi vertido, em ambiente estéril, um volume de 10 mL de meio de cultura em placas de Petri devidamente esterilizadas em estufa à 170°C por 2 horas ou autoclave à pressão de 1Kg.F.cm^{-2} e 121°C durante 20 minutos. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico após a solidificação do meio de cultura e então permaneceram armazenadas por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e foram analisadas visualmente quanto a contaminação momentos antes da condução dos experimentos.

- Meio Czapek Sacarose-Nitrato-Ágar (CZA)

O meio de cultura CZA foi preparado utilizando sacarose a 3% (p/v), K_2HPO_4 a 0,1% (p/v), $NaNO_3$ a 0,2% (p/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,05% (p/v), KCl a 0,05% (p/v), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a 0,001% (p/v), ágar a 1,7% (p/v) e água destilada. Os nutrientes foram dissolvidos em metade do volume e, logo depois, foi completado o volume final. Este meio de cultura teve seu pH aferido para 5,8, o ágar foi então acrescido para que fosse fundido e homogeneizado ao meio. Finalmente, o meio foi vertido em erlenmeyers de 250 mL até aproximadamente um terço da capacidade do recipiente, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de $1Kg.F.cm^{-2}$ e $121^\circ C$ durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização, o meio foi vertido, em ambiente estéril, um volume de 10 mL de meio de cultura em placas de Petri devidamente esterilizadas em estufa à $170^\circ C$ por 2 horas ou autoclave à pressão de $1Kg.F.cm^{-2}$ e $121^\circ C$ durante 20 minutos. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico após a solidificação do meio e então permaneceram armazenadas por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e foram analisadas visualmente quanto a contaminação momentos antes da condução dos experimentos.

- Meio Sabouraud-dextrose-ágar (SAB)

O meio de cultura SAB foi preparado utilizando dextrose a 4% (p/v), Peptona a 1% (p/v), ágar a 1,7% (p/v) e água destilada. Os nutrientes foram dissolvidos em metade do volume e, logo depois, foi completado o volume final. Este meio de cultura teve seu pH aferido para 5,8, o ágar foi então acrescido para que fosse fundido e homogeneizado ao meio. Finalmente, o meio foi vertido em erlenmeyers de 250 mL até aproximadamente um terço da capacidade do recipiente, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de $1Kg.F.cm^{-2}$ e $121^\circ C$ durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização, o meio foi vertido, em ambiente estéril, um volume de 10 mL de meio de cultura em placas de Petri devidamente esterilizadas em estufa à $170^\circ C$ por 2 horas ou autoclave à pressão de $1Kg.F.cm^{-2}$ e $121^\circ C$ durante 20 minutos. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico após a solidificação do meio e então permaneceram armazenadas por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e foram analisadas visualmente quanto a contaminação momentos antes da condução dos experimentos.

- Triptona-Soja-Ágar (TSA)

O meio de cultivo foi preparado utilizando-se triptona 1,5%, soja 0,5%, NaCl 0,5%, ágar 1,5% e água destilada. Este teve seu pH aferido para 5,8 e, então, esterilizado em autoclave à pressão média de 1KgF/cm² (121°C) durante 15 minutos.

O meio de cultura TSA foi preparado utilizando triptona a 1,5%, extrato de soja a 0,5%, NaCl a 0,5%, ágar a 1,7% e água destilada. Os nutrientes foram dissolvidos em metade do volume e, logo depois, foi completado o volume final. Este meio de cultura teve seu pH aferido para 5,8, o ágar foi então acrescido para que fosse fundido e homogeneizado ao meio. Finalmente, o meio foi vertido em erlenmeyers de 250 mL até aproximadamente um terço da capacidade do recipiente, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de 1Kg.F.cm⁻² e 121°C durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização, o meio foi vertido, em ambiente estéril, um volume de 10 mL de meio de cultura em placas de Petri devidamente esterilizadas em estufa à 170°C por 2 horas ou autoclave à pressão de 1Kg.F.cm⁻² e 121°C durante 20 minutos. As placas de Petri foram vedadas com filme plástico após a solidificação do meio e então permaneceram armazenadas por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e foram analisadas visualmente quanto a contaminação momentos antes da condução dos experimentos.

5.2.2 Preparação da iluminação utilizada para o experimento sobre crescimento radial dos fungos endofíticos isolados.

O fornecimento de luz intermitente ao experimento foi feito através de lâmpada fluorescente Osram Luz do Dia de 20W ligada constantemente e disposta a 1 metro de altura de onde estava instalado o experimento. A supressão da luz foi feita através de caixas de papelão que impediam a entrada de luz no experimento.

5.2.3 Influência do meio de cultura e da iluminação in vitro sobre o crescimento radial dos fungos endofíticos isolados.

O experimento foi conduzido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 1 dos 6 meios de cultura descritos anteriormente. No centro da parte inferior externa de cada placa de

Petri foram feitos 2 seguimentos perpendiculares que foram utilizados para a medição dos diâmetros do crescimento radial dos fungos e, no interior das placas, foi introduzido um disco de 0,6 cm de uma cultura de 7 dias de cada fungo endofítico isolado. As placas foram vedadas com filme plástico, identificadas e encaminhadas para as áreas na presença ou ausência de iluminação através de sorteio respeitando o delineamento e o esquema fatorial adotados.

As medições foram realizadas diariamente com o auxílio de um paquímetro até que pelo menos 1 dos fungos isolados chegasse a borda da placa de Petri.

5.2.4 Delineamento experimental e análise estatística.

Neste experimento foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 6×2 , sendo que, o fator a foi compostos pelos 6 meios de cultura (BDA, BSA, CA, CZP, SAB e TSA) e o fator b pelos 2 estados de iluminação (Presença e ausência de iluminação) totalizando 12 tratamentos com 10 repetições cada. A parcela experimental foi representada pela medida em cm de 1 diâmetro do crescimento radial de cada placa de Petri medida com o auxílio de paquímetro.

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita através de análise de variância pelo teste F de Snedecor inicialmente e para as médias obtidas foi utilizado o teste de Tukey a 1% de probabilidade. As Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico ESTAT – Sistema para análises estatísticas 2.0 do Polo Computacional/Depto. De Ciências Exatas-UNESP-FCAU-Campus de Jaboticabal.

5.3 Resultados e discussão

Nas condições *in vitro* em que foram submetidos os isolados endofíticos foi possível observar que para o isolado *Phomopsis* sp., de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes, a iluminação teve um efeito negativo no crescimento radial, fato observado em 5 dos 6 meios de cultura em que o fungo foi experimentado. O meio BSA foi o único em que a luminosidade não influenciou negativamente, mostrando que há a possibilidade de crescimento deste fungo nas duas condições de forma indiferente quando se analisa o crescimento radial (Tabela 10).

A interação entre os fatores é visível quando os meios BDA e SAB, na presença da luz, têm o mesmo efeito sobre o crescimento, diferente do que ocorre na ausência da luz em que o meio SAB se iguala ao BSA e ao TSA (Tabela 10).

De uma forma geral, o fungo endofítico *Phomopsis* sp. teve crescimento radial maior quando introduzido no meio de cultura BSA na ausência de luz (Tabela 10).

Tabela 10- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos*.

Meio de cultura	Luminosidade	
	Presença	Ausência
BDA	4,9800 bBC	5,9500 aC
BSA	6,8800 aA	7,0000 aA
CA	3,9000 bD	4,8400 aD
CZP	4,3600 bCD	5,5700 aCD
SAB	5,6700 bB	6,8400 aAB
TSA	4,8700 bC	6,1300 aBC
Média*	5,1100 b	6,0550 a

*Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não possuem diferença estatística a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Diferente do observado com *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes a presença da luz apresentou efeito negativo sobre o crescimento radial do fungo *Guignardia* sp. no meio de cultura BSA, assim como no meio SAB (Tabela 11).

A interação observada entre a luz e o meio BSA fez com que ele reduzisse o crescimento do fungo *Guignardia* sp. deixando de apresentar valores superiores aos encontrados nos meios BDA e CZP na ausência de luz (Tabela 11).

A luz apresentou efeito negativo sobre o crescimento radial do fungo endofítico

Guignardia sp. e os meios que apresentaram resultados superiores foram o BDA e o CZP quando comparados com os demais meios de cultura experimentados (Tabela 11).

Tabela 11- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo *Guignardia* sp. isolado de *A. cochliocarpos*.

Meio de cultura	Luminosidade	
	Presença	Ausência
BDA	6,8600 aA	7,0000 aA
BSA	4,8300 bB	7,0000 aA
CA	5,7000 aAB	5,4600 aB
CZP	6,8300 aA	7,0000 aA
SAB	2,8000 bC	5,2500 aB
TSA	0,9100 aD	0,8700 aC
Média*	4,6550 b	5,4300 a

*Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não possuem diferença estatística a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O fungo endofítico *Pleosporales* sp. apresentou crescimento radial igual em 4 meios de cultura, são eles o BDA, BSA, CA e CZP ficando os meios SAB e depois o TSA com os resultados mais inferiores (Tabela 12).

A luz apresentou, também, efeito negativo sobre o crescimento radial do fungo endofítico *Pleosporales* sp. como os demais isolados de *A. cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes (Tabela 12).

Nos meios BDA, CZP e SAB não houve interação entre luz e meios de cultura que influenciasse o crescimento radial do fungo *Pleosporales* sp. devido a isto nesses meios de cultura o crescimento deste fungo foi igual tanto na presença quanto na ausência de luz (Tabela 12).

Tabela 12- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos*.

Meio de cultura	Luminosidade	
	Presença	Ausência
BDA	6,1800 aA	6,4500 aB
BSA	6,3100 bA	6,9400 aAB
CA	6,0300 bAB	6,9800 aA
CZP	6,4200 aA	6,5900 aAB
SAB	5,5400 aB	5,5300 aC
TSA	3,1900 bC	3,9600 a D
Média*	5,6117 b	6,0750 a

*Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não possuem diferença estatística a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* (L.) Taub. não apresentou crescimento diferenciado entre os meios de cultura BDA e BSA, entretanto, a ausência de luz ainda continuou tendo efeito negativo no crescimento radial deste fungo. Não foram identificadas interações entre os meios de cultura e luz, mas de uma forma geral no experimento a ausência de luz mostrou resultado superior que aquele na presença de luz (Tabela 13).

Tabela 13- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum*.

Meio de cultura	Luminosidade		Média*
	Presença	Ausência	
BDA	6,3400	6,7400	6,5400 A
BSA	6,3300	6,8000	6,5650 A
CA	3,1400	3,1200	3,1300 C
CZP	4,6300	4,8400	4,7350 B
SAB	4,8700	5,5100	5,1900 B
TSA	3,1000	3,7600	3,4300 C
Média*	4,7350 b	5,1283 a	

*Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não possuem diferença estatística a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O isolado DeF2 apresentou crescimento idêntico em 4 dos 6 meios de cultura somente

nos meios de cultura CZP e TSA seu crescimento radial foi reduzido devido a uma interação negativa na presença da luz (Tabela 14).

Tabela 14- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico DeF2 isolado de *D. ecastophyllum*.

Meio de cultura	Luminosidade	
	Presença	Ausência
BDA	6,8000 aA	7,0000 aA
BSA	7,0000 aA	7,0000 aA
CA	7,0000 aA	7,0000 aA
CZP	4,9000 bC	5,9300 a C
SAB	7,0000 aA	6,9500 aA
TSA	5,6500 bB	6,4600 a B
Média*	6,3917 b	6,7233 a

*Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não possuem diferença estatística a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O fungo endofítico *Nigrospora* sp. cresceu de forma mais diferenciada quando inoculado em meio de cultura SAB que teve interação negativa com a luz juntamente com o meio de cultura CA. A Luz, como nos demais fungos experimentados, apresentou um efeito negativo reduzindo o crescimento radial do fungo endofítico *Nigrospora* sp (Tabela 15).

Tabela 15- Efeito do meio de cultura e da luminosidade sobre o crescimento radial (cm) do fungo endofítico *Nigrospora* sp. isolado de *D. ecastophyllum*.

Meio de cultura	Luminosidade	
	Presença	Ausência
BDA	6,6200 aA	6,4800 aA
BSA	6,7100 aA	6,4200 aA
CA	5,0700 bB	6,5400 aA
CZP	6,1400 aAB	6,4100 aA
SAB	3,2300 bC	4,8400 aB
TSA	5,7000 aAB	6,0200 aAB
Média*	5,5783 b	6,1183 a

*Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, não possuem diferença estatística a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.4 Conclusão

A partir dos resultados obtidos dos experimentos foi possível concluir que:

Entre os meios de cultura testados neste experimento, BDA e BSA foram aqueles que apresentaram resultados superiores em praticamente todos os fungos endofíticos experimentados.

A luminosidade teve efeito negativo no crescimento de todos os fungos endofíticos testados.

6 INTER-RELAÇÕES OBSERVADAS ENTRE OS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *A. COCHLIOCARPOS* . E *D. ECASTOPHYLLUM* .

6.1 Introdução

Dentro de uma planta hospedeira, os endofíticos mantêm inter-relações com outros microrganismos, tais como: antibiose, indução de resistência, parasitismo e uma constante disputa por espaço e por alimento fornecido pela planta hospedeira (Johnson; Whitney, 1992).

A produção de compostos como antibióticos e outros metabólitos, por microrganismos endofíticos, já sugeria que eles poderiam controlar doenças de plantas. De fato, endofíticos encontrados em gramíneas, como *Acremonium coenophialum*, tem efeito inibitório sobre vários patógenos desse grupo de plantas (White e Cole, 1985).

Muitos endofíticos inibem o crescimento e até mesmo causam a morte desses microrganismos, evitando que a planta hospedeira desenvolva determinadas doenças causadas por eles. A maioria dos relatos utilizando antagonistas para o controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos apresenta *Trichoderma* spp. como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (Smith et al., 1990; Martins-Corder; Melo, 1998; Silva et al., 1999; De Marco et al., 2000; Gomes et al., 2001; Ethur et al., 2001; Barbosa et al., 2001; Moreira, 2002; Cúndom et al., 2003; Montealegre, 2005; Remuska e Pria, 2007; Martins, 2007; Lisboa, 2007; Silva., 2008).

Apesar disso, tendo em vista que um endofítico pode ser um patógeno em potencial Sieber (2007) afirma que a diversidade de isolados endofíticos é normalmente alta mesmo em pequenas quantidades de tecido vegetal e mostra como exemplo que foi possível detectar mais de seis espécies de endofíticos em 1,5 cm² da casca de brotos de castanheira. O número de espécies que podem ser detectadas depende de fatores bióticos, abióticos e experimentais.

Os microrganismos com potencial para alterar as funções vitais dos fitopatógenos são considerados antagonistas. Os endofíticos são antagonistas quando ocupam o mesmo nicho ecológico do fitopatógeno, competindo por espaço e por nutrientes dentro da planta, nessa competição ocorre a produção de substâncias tóxicas ao patógeno e de alguma forma podem fazer com que a planta hospedeira desenvolva resistência às doenças (Melo e Azevedo, 1998).

Para Mariano (1993) os métodos utilizados no processo de seleção de microrganismos antagonísticos podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*, onde a maioria dos trabalhos publicados são ensaiados inicialmente em laboratórios, para testar posteriormente *in vivo*, no campo, ou em casa de vegetação, onde todas as condições dos ensaios são controladas.

Sendo que, em laboratório, método da cultura pareada está entre os mais frequentes nos trabalhos com antagonismo (Martins-Corder e Melo, 1998; Ethur et al., 2001; Gomes et al., 2001; Amorim; Melo, 2002; Moreira, 2002; Kupper et al., 2003; Rubini, 2005; Maki, 2006; Lisboa et al., 2007; Martins et al., 2007). Esse método tanto pode ser feito com ágar em placa, ou em lâmina.

O objetivo deste capítulo é identificar as inter-relações entre os isolados obtidos de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Método de crescimento pareado em meio de cultura.

Inicialmente, foram preparadas culturas dos seis fungos endofíticos isolados em meio de cultura BDA, para isso foram retirados discos de 6 mm de diâmetro de culturas prévias dos fungos e, em ambiente estéril, inoculadas em placas de Petri já previamente preparadas contendo o meio de crescimento BDA. Logo após, foram devidamente lacradas com filme plástico e levadas para ambiente isento de luz por um período de 7 dias em temperatura ambiente.

A partir das culturas novas de cada fungo endofítico isolado foi possível ter material em pleno crescimento para realizar o experimento de crescimento pareado em meio de cultura que seguiu a metodologia descrita por Bell et al., (1982) com modificações. Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro previamente preparadas contendo meio BDA onde foram introduzidos discos de 6 mm de diâmetro das culturas de cada fungo endofítico a 1 cm de distância da borda da placa em que foi introduzido. Cada placa de Petri apresentou pelo menos 1 disco de 6 mm com a cultura recente de cada fungo endofítico que foi considerado como placa controle ou contendo 2 discos de 6 mm das possíveis combinações entre os fungos endofíticos isolados. Como mostrado na tabela 16 abaixo:

Tabela 16- Possíveis combinações utilizadas *in vitro* para crescimento pareado em meio de cultura entre os fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

	AcF1	AcF2	AcF3	DeF1	DeF2	DeNs
-	*	*	*	*	*	*
AcF1	*					
AcF2	*	*				
AcF3	*	*	*			
DeF1	*	*	*	*		
DeF2	*	*	*	*	*	
DeNs	*	*	*	*	*	*

*:combinação utilizada no experimento; - :ausência de disco com fungo endofítico; área hachurada: combinação já existente e por isso não mais utilizada no experimento.

O experimento foi montado em ambiente estéril e as placas de Petri foram prontamente lacradas com filme plástico e levadas para ambiente isento de luz por um período

de sete dias em temperatura ambiente no laboratório. Aos sete dias, foram realizadas medições do crescimento micelial, com o uso de um paquímetro, de cada disco introduzido nas placas de Petri, foram registradas através de fotografias as possíveis relações entre os fungos e finalmente os dados foram analisados.

6.2.2 Análise estatística do experimento de crescimento pareado em meio de cultura

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado constituído por 6 tratamentos (possíveis combinações entre cada endofíticos isolados) com 4 repetições e a parcela experimental utilizada seguiu a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do crescimento micelial} = [(a-b) \times 100] \times a^{-1}$$

Onde,

a = medida do crescimento do fungo endofítico utilizado com controle;

b = medida do crescimento do fungo endofítico crescido com a presença do fungo utilizado como antagonista.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o teste F de Snedecor e as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 1% de probabilidade. As Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico ESTAT – Sistema para análises estatísticas 2.0 do Polo Computacional/Depto. De Ciências Exatas-UNESP-FCAU-Campus de Jaboticabal. A partir dos dados ainda foram construídos gráficos utilizando o programa OriginPro 8 SR0 v 8.0724 (B724).

6.3 Resultados e Discussão

Cultura pareada do fungo endofítico *Phomopsis* sp. (AcF1) isolado de *A. cochliocarpos* e os demais fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

Quando o crescimento do fungo *Phomopsis* sp (AcF1) isolado de *A. cochliocarpos* foi analisado através das imagens coletadas aos 7 dias de crescimento pareado foi possível observar que suas hifas, ao encontrar a colônia do fungo *Guignardia* sp. (AcF2) isolado também de *A. cochliocarpos*, sobrepõe parte das hifas deste fungo avançando no espaço ocupado por este e demonstrando possibilidade de micoparasitismo (Figura 17 E e F).

Com o objetivo de testar o potencial antagonístico de fungos contra o fungo *Crinipellis perniciosa*, causador de uma severa doença em cacauzeiros, conhecida como vassoura-de-bruxa Rubini et al. (2005) isolaram fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.) e através da identificação morfológica e da sequência de rDNA foram identificados os fungos pertencentes a comunidade endofítica do cacauzeiro e nos testes de antagonismo *in vitro*, 16,22% dos isolados inibiram o crescimento do fitopatógeno *Crinipellis perniciosa*. No antagonismo *in vivo*, *Gliocladium catenulatum* reduziu em mais de 70% os sintomas da vassoura-de-bruxa.

A formação do halo de inibição pode ser visto na presença dos fungos *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* (DeF1) e do fungo DeF2 demonstrando possível liberação de substâncias com características antifúngicas no meio de cultura impedindo assim o avanço destes dois fungos sobre sua colônia. Diferentes testes de antagonismo *in vitro* foram realizados por Martins-Corder e Melo (1998), utilizando *Trichoderma* spp. contra o fungo fitopatogênico *Verticillium dahliae*. Os autores constataram que a maioria dos antagonistas colonizou e produziu esporos em abundância sobre as colônias de *V. dahliae*. Os isolados de *Trichoderma* spp. secretaram metabólitos tóxicos que causaram a degradação das hifas hospedeiras, inibindo o desenvolvimento de *V. dahliae*. No contato íntimo entre as hifas, o antagonista enrolou-se no *V. dahliae*, formando estruturas semelhantes a ganchos, causando a destruição da parede celular, provavelmente para obter nutrientes a partir das células mortas.

Ethur et al. (2001) selecionaram isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de antagonismo sobre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, um fungo do solo que causa uma doença conhecida como mofo branco. Três isolados cresceram sobre o patógeno, sendo que dois deles tomaram menos de dois terços da placa, mas um deles cresceu e tomou mais de dois terços da placa. O confronto direto entre o antagonista e o patógeno demonstrou que os

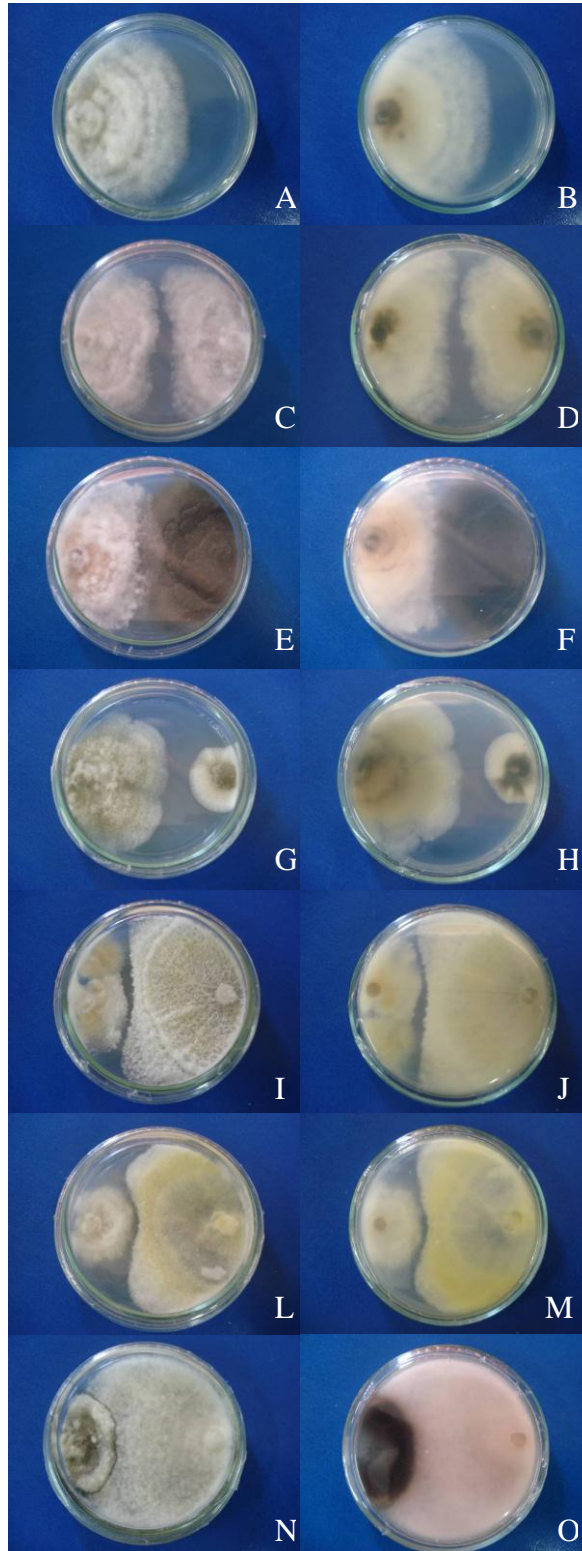
três isolados utilizaram outras formas de antagonismo, além da antibiose.

Moreira et al. (2002) selecionaram e avaliaram a eficiência de microrganismos antagonísticos ao fitopatógeno *Monilinia fructicola*, causador da podridão parda nos pessegueiros (*Prunus persicae* (L.) Batsch.). Os fungos isolados dos gêneros *Trichothecium* spp. e *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento do patógeno através da produção de substâncias inibitórias. Os isolados de *Trichoderma* spp. e *Penicillium* sp. cresceram sobre o patógeno. Nos frutos, os antagonistas que exerceram maior controle da doença foram os isolados de *Trichothecium* spp., acima de 80% de controle.

O fungo *Phomopsis* sp. (AcF1) isolado de *A. cochliocarpos* não conseguiu impedir a sobreposição da sua colônia pelo fungo *Nigrospora* sp. que praticamente envolveu totalmente sua colônia. Isto mostra que apesar do microrganismo apresentar vários mecanismos para subjugar outros, não o torna imuni as estratégias de sobrevivência dos demais microrganismos. Na busca de um controle para a doença do trigo (*Triticum aestivum* L.) conhecida por mancha bronzeada, causada pelo fungo *Drechslera tritici-repentis*, Linhares et al. (1995) isolaram cem microrganismos de plantas de trigo e avaliaram o comportamento *in vitro* desses microrganismos contra *Drechslera tritici-repentis*. Os pesquisadores detectaram uma variabilidade na ação dos microrganismos frente aos diferentes isolados do patógeno. Entre os microrganismos testados, 12% apresentaram um controle de 80 a 100% sobre todos os isolados do patógeno *Drechslera tritici-repentis*.

Objetivando selecionar antagonistas à *Sclerotinia sclerotiorum* Ethur (2005) isolou 112 fungos de quatro gêneros, e testaram esses isolados *in vitro* e *in vivo* contra o fitopatógeno. Destes, 17 isolados do gênero *Trichoderma* foram considerados potencialmente ativos nos testes *in vitro*. Os isolados de *Penicillium* spp. demonstraram uma inibição de 0 a 48% e um isolado apresentou uma inibição 77%. Os isolados de *Aspergillus* spp. (inibição de 0 a 1,4%) e *Fusarium* spp. (inibição de 0 a 2,4%) não mostraram bons desempenhos quando comparados aos isolados de *Trichoderma* spp. Mesmo demonstrando os melhores resultados, a variabilidade entre isolados de *Trichoderma* foi evidente, pois dos 73 isolados obtidos, oito não apresentaram qualquer inibição no crescimento micelial do fitopatógeno, mas a maior parte dos isolados (89%) apresentou índices variados de inibição micelial de *S. sclerotiorum*.

Figura 17- Cultura pareada do fungo *Phomopsis* sp. (AcF1) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo *Phomopsis* sp. (AcF1) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em C e D; a direita nas demais placas estão os fungos: *Guignardia* sp. em E e F; Fungo da ordem Pleosporales em G e H; *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* I e J; fungo DeF2 em L e M; *Nigrospora* sp. em N e O.

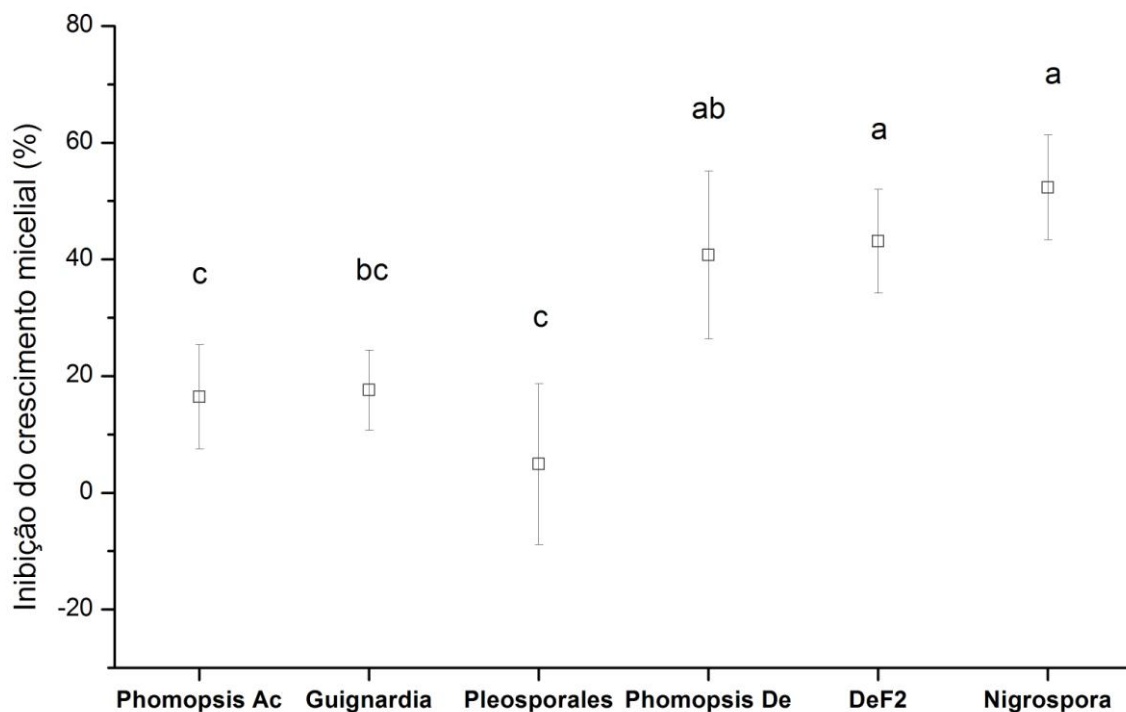


Fonte: (Autor, 2011)

Quando os dados analisados foram referentes à porcentagem de inibição do crescimento micelial foi possível observar que os fungos endofíticos isolados de *D. ecastophyllum* foram antagonistas mais efetivos. Na figura 18 é possível observar que os fungos isolados do mesmo hospedeiro, no caso *A. cochliocarpos*, foram antagonistas pouco expressivos com uma porcentagem de inibição abaixo de 20% enquanto os fungos *Nigrospora* sp., DeF2 e *Phomopsis* sp. isolados de *D. ecastophyllum* apresentaram uma porcentagem de inibição acima de 40%.

Rocha et al. (2009) selecionaram fungos endofíticos da planta medicinal confrei *Symphytum officinale* L. buscando o controle biológico *in vitro* do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Dos doze endofíticos, quatro deles (*Trichophyton* sp., *Chrysosporium* sp., *Candida pseudotropicalis* e *Candida tropicalis*) apresentaram os melhores resultados, exibindo 46,6% a 50% de redução no crescimento micelial do fitopatógeno.

Figura 18-Antagonismo entre o fungo *Phomopsis* sp. (AcF1) e os demais fungos endofíticos isolados de *A.cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras =desvio padrão; n=4; Ac =isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.



Fonte: (Autor, 2011)

6.3.1 Cultura pareada do fungo endofítico *Guignardia* sp. (AcF2) isolado de *A. cochliocarpos* e os demais fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

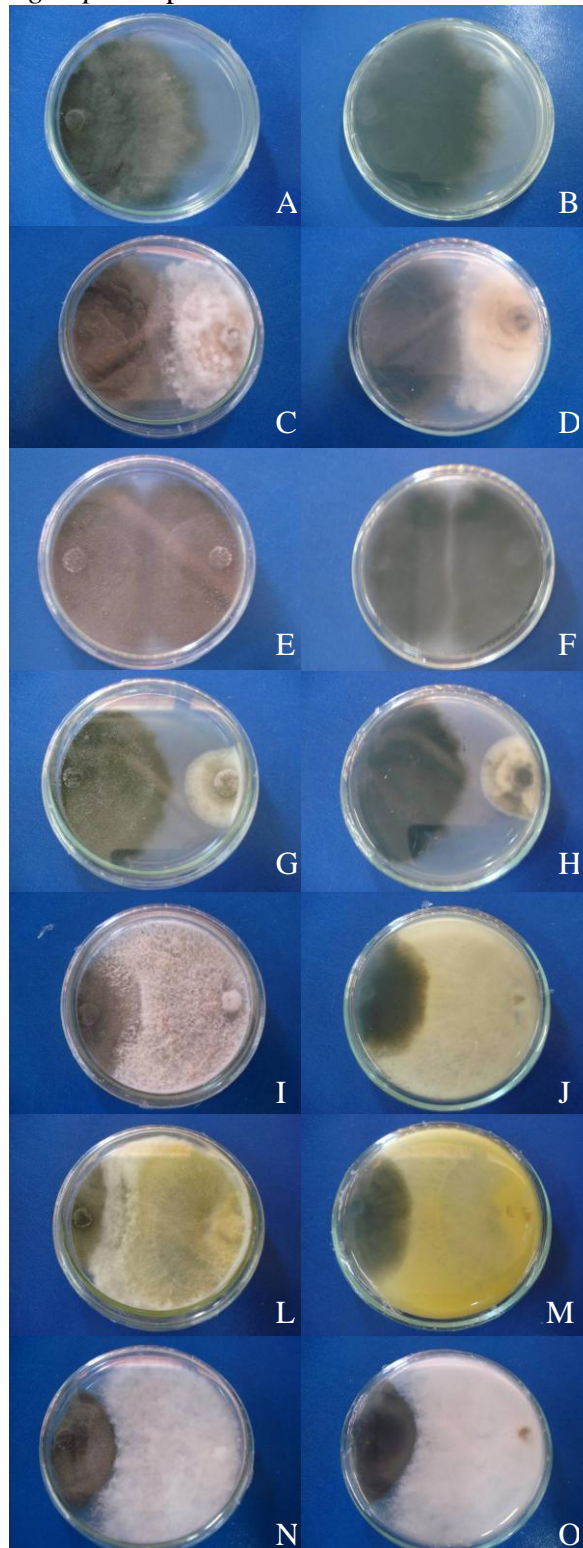
Quando foram analisadas as imagens da figura 19C, 19I e 19L foi possível observar uma tendência de sobreposição das hifas dos fungos antagonistas a colônia do fungo *Guignardia* sp. Os dois fungos *Phomopsis* sp., o isolado de *A. cochliocarpos* e o outro isolado de *D. ecastophyllum*, juntamente com o fungo DeF2 avançaram sobre as hifas do fungo *Guignardia* sp. e diferente do observado com o fungo *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos*, o fungo *Nigrospora* sp. não avançou sobre a colônia do fungo *Guignardia* sp.

Ensaio *in vitro* de biocontrole têm sido realizados utilizando-se a interação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula* spp. observando inibição do crescimento micelial de *Guignardia citricarpa* por meio da produção de enzimas que interferem no desenvolvimento da hifa deste patógeno (SOARES et al., 2000).

Diversas vezes as interações entre as colônias se mostram de forma agressiva como observado por Mello (2008) que estudou o antagonismo entre *Dicyma pulvinata* contra *Fusicladium macrosporum*, em folhas de seringueira. *D. pulvinata* invadiu os esporos de *F. macrosporum* desintegrando-os e esvaziando os seus conteúdos, e além disso sobrepôs completamente o patógeno.

Não foram observados sinais de formação de halos de inibição quando o fungo *Guignardia* sp. se mostrava presente na cultura pareada com fungos isolados de ambos os hospedeiros *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*

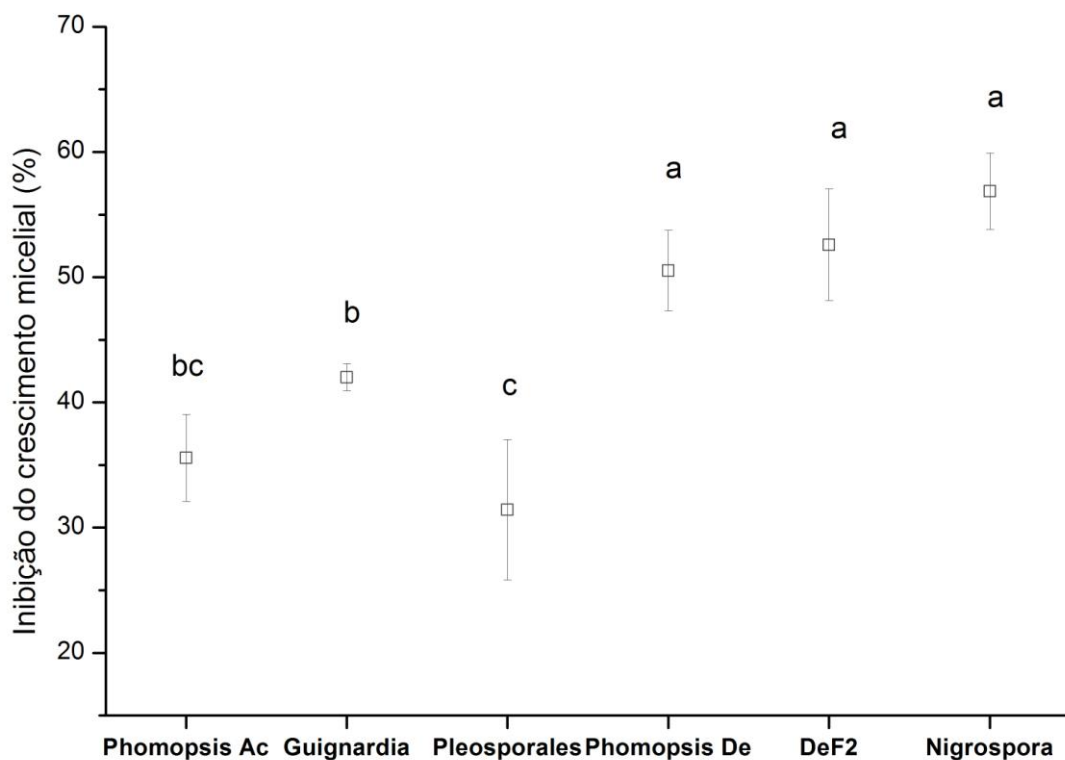
Figura 19- Cultura pareada do fungo *Guignardia* sp. (AcF2) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo *Guignardia* sp. (AcF2) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em E e F; a direita nas demais placas: *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* em C e D; Fungo da ordem Pleosporales em G e H; *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophylum* I e J; fungo DeF2 em L e M; *Nigrospora* sp. em N e O.



Fonte: (Autor, 2011)

Os dados colhidos no experimento de inibição do crescimento micelial do fungo endofítico *Guignardia* sp. mostraram que os isolados provenientes de *D. ecstophyllum* apresentaram percentuais de inibição significativamente superiores (50,53% a 56,87%) aos observados dos isolados de *A. cochliocarpos* (Figura 20). O fungo da ordem Pleosporales e o fungo *Phomopsis* sp. isolados de *A. cochliocarpos*, neste experimento, foram considerados os antagonistas menos eficientes, possivelmente, por apresentarem uma velocidade de crescimento baixo ($0,2 \text{ cm.dia}^{-1}$) em relação aos outros fungos (por exemplo, *Nigrospora* sp. que cresceu em uma velocidade de $0,93 \text{ cm.dia}^{-1}$).

Figura 20- Antagonismo entre o fungo *Guignardia* sp. (AcF2) e os demais fungos endofíticos isolados de *A.cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras =desvio padrão; n=4; Ac =isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.



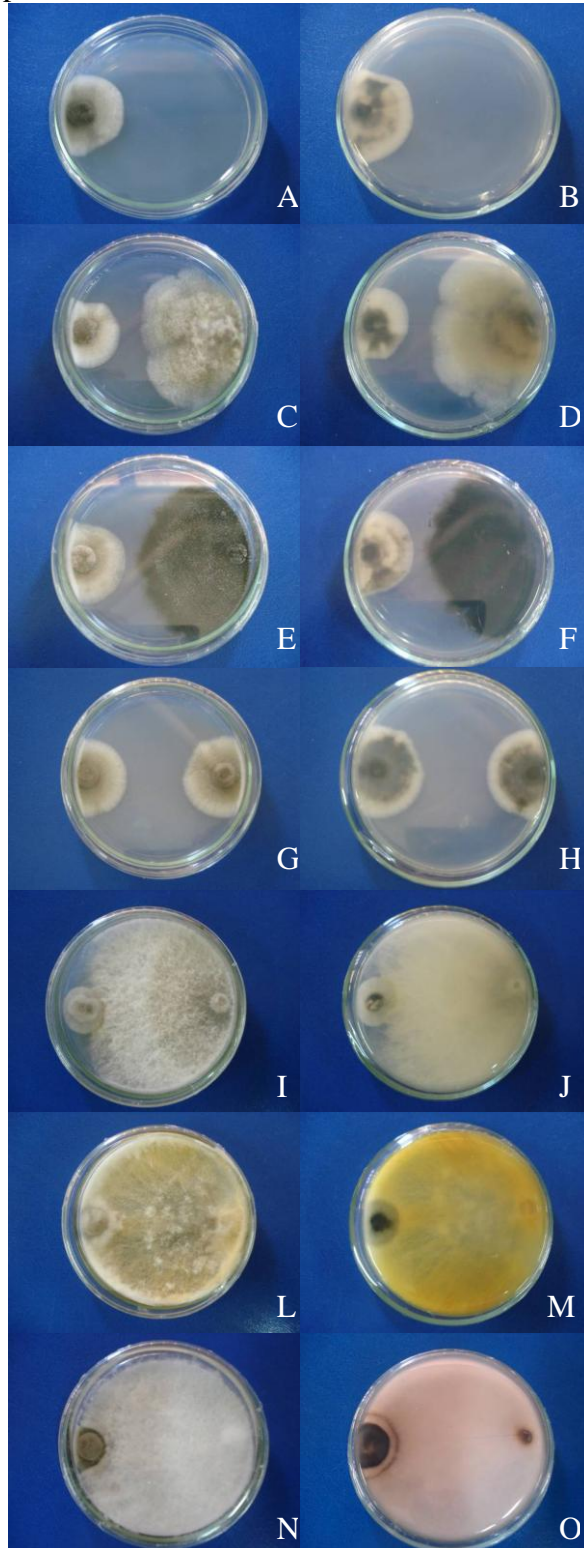
Fonte: (Autor, 2011)

6.3.2 Cultura pareada do fungo endofítico da ordem Pleosporales (AcF3) isolado de *A. cochliocarpos* e os demais fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

Na análise das imagens da figura 21 foi possível observar que os únicos fungos que conseguiram tocar as hifas do fungo da ordem Pleosporales foram aqueles isolados a partir da *D. ecastophyllum*. O fungo DeF2 avançou sobre as hifas do fungo da ordem Pleosporales encobrindo totalmente a colônia, já o fungo *Nigrospora* sp. só o fez de forma parcial (figura 21L e N).

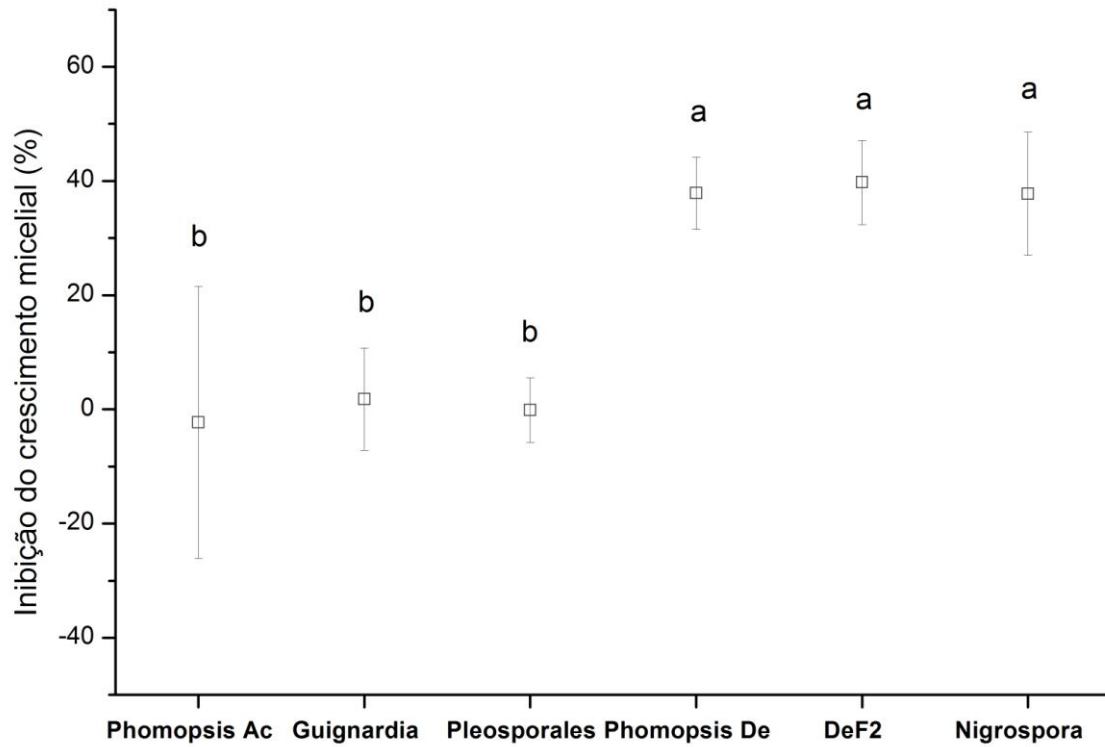
A baixa velocidade de crescimento do fungo da ordem Pleosporales ($0,2 \text{ cm.dia}^{-1}$) aliada a dos demais fungos isolados de *A. cochliocarpos* resultou na pequena inibição do crescimento deste fungo como pode ser observado na figura 22. Aparentemente houve um leve incremento no crescimento deste fungo quando cresceu na presença do fungo *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* cerca de 2,26% , mas, estatisticamente, não houve diferença significativa entre os fungos isolados de *A. cochliocarpos*. Os fungos isolados de *D. ecastophyllum* também não diferiram de forma significativa entre eles, mas diferiram dos fungos isolados de *D. ecastophyllum* agora de forma superior inibindo o crescimento das hifas do fungo da ordem Pleosporales em 39,76% no caso do fungo *Nigrospora* sp. utilizado como antagonista neste experimento.

Figura 21- Cultura pareada do fungo da ordem Pleosporales. (AcF3) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo da ordem Pleosporales (AcF3) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em G e H; a direita nas demais placas: *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* em C e D; *Guignardia* sp. em E e F; *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* I e J; fungo DeF2 em L e M; *Nigrospora* sp. em N e O.



Fonte: (Autor, 2011)

Figura 22- Antagonismo entre o fungo da ordem Pleosporales (AcF3) e os demais fungos endofíticos isolados de *A.cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras = desvio padrão; n = 4; Ac = isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade



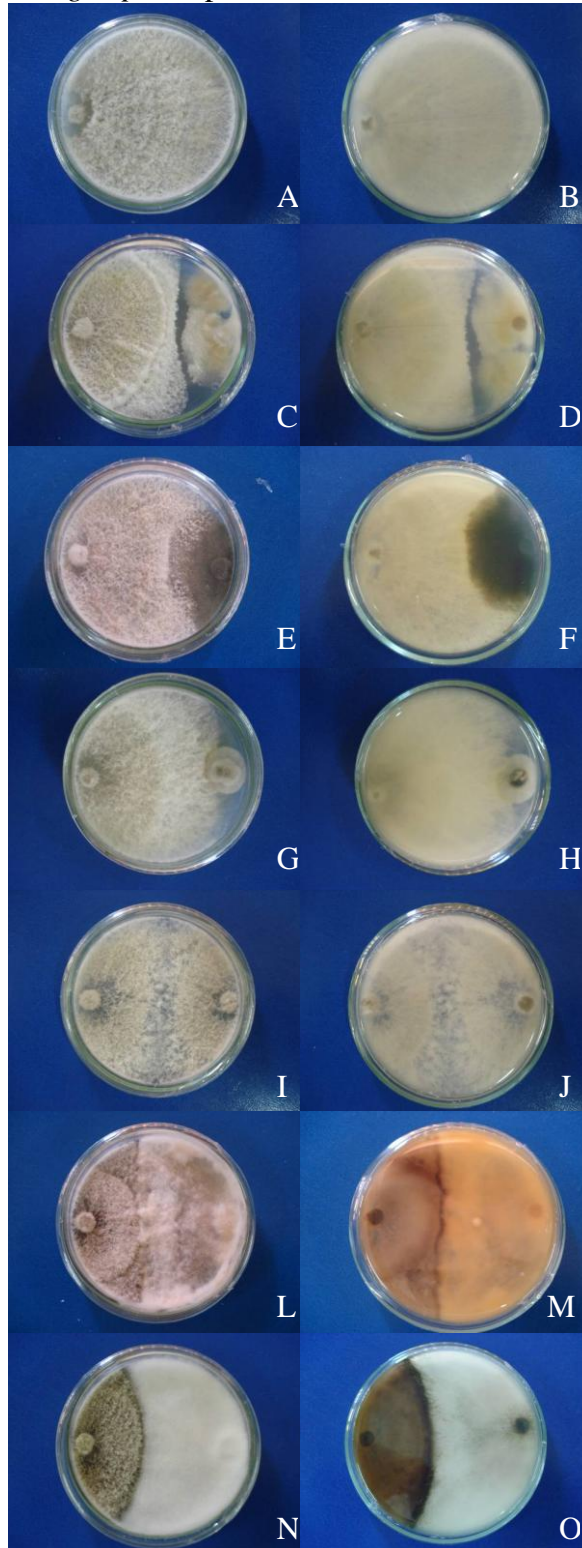
Fonte: (Autor, 2011)

6.3.3 Cultura pareada do fungo endofítico *Phomopsis* sp. (DeF1) isolado de *D. ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

A partir da análise da figura 23 A foi possível observar que o fungo *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* conseguiu ocupar toda a placa de Petri, já que apresentou uma velocidade de crescimento superior ($0,92 \text{ cm.dia}^{-1}$) quando comparado com os fungos isolados de *A. cochliocarpos* que não ocuparam totalmente as placas em que se encontraram. Isto demonstra sua maior aptidão em ocupar substratos diferentes da planta hospedeira comparado com os demais fungos utilizados neste trabalho. Na figura 23 C observa-se que apesar da existência de um halo de inibição produzido pelo fungo *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* utilizado como antagonista ele ocupou um área visivelmente maior da placa neste cultivo pareado.

Já na figura 23 E, foi observado que além de ocupar uma área superior ao ocupado pelo fungo *Guignardia* sp. ele ainda avançou suas hifas sobre a colônia deste fungo mostrando evidência de micoparasitismo. Quando cultivado na presença do fungo *Nigrospora* sp. não teve sua colônia invadida pelas hifas deste fungo, fato este diferente do ocorrido com o fungo *Phomopsis* sp. isolado do outro hospedeiro a *A. cochliocarpos*. mostrando que ocorre mecanismos de sobrevivência diferenciados dentro do gênero de fungo *Phomopsis*.

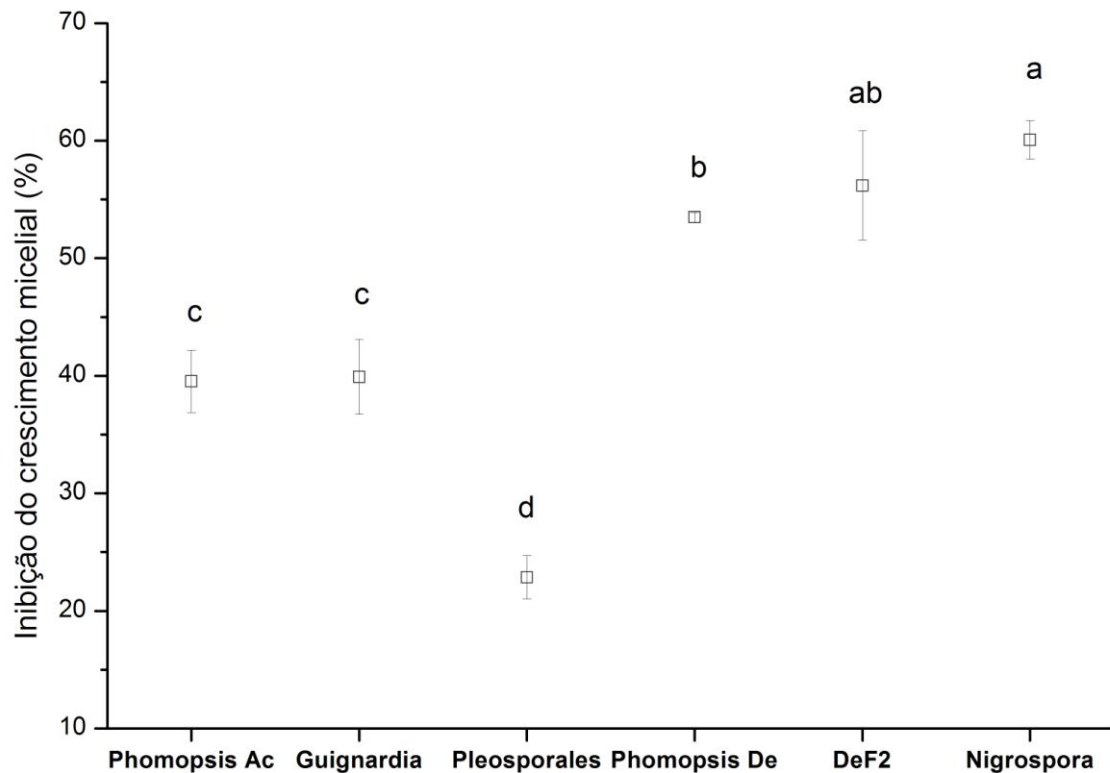
Figura 23-Cultura pareada do fungo *Phomopsis* sp. (DeF1) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo *Phomopsis* sp. (DeF1) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em I e J; a direita nas demais placas: *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* em C e D; *Guignardia* sp. em E e F; fungo da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos* em G e H; fungo DeF2 em L e M; *Nigrospora* sp. em N e O.



Fonte: (Autor, 2011)

Na figura 24 foi observado que o antagonista com menor eficiência nesta cultura pareada foi o fungo da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos* apresentando uma porcentagem de inibição do crescimento de DeF2 significativamente abaixo de todos os outros fungos testados neste experimento. Ainda neste experimento foi possível observar que os fungos isolados de *D. ecastophyllum* foram os três os antagonistas mais eficientes com relação aos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos*.

Figura 24- Antagonismo entre o fungo *Phomopsis* sp. (DeF1) isolado de *D. ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A.cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras = desvio padrão; n = 4; Ac = isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade



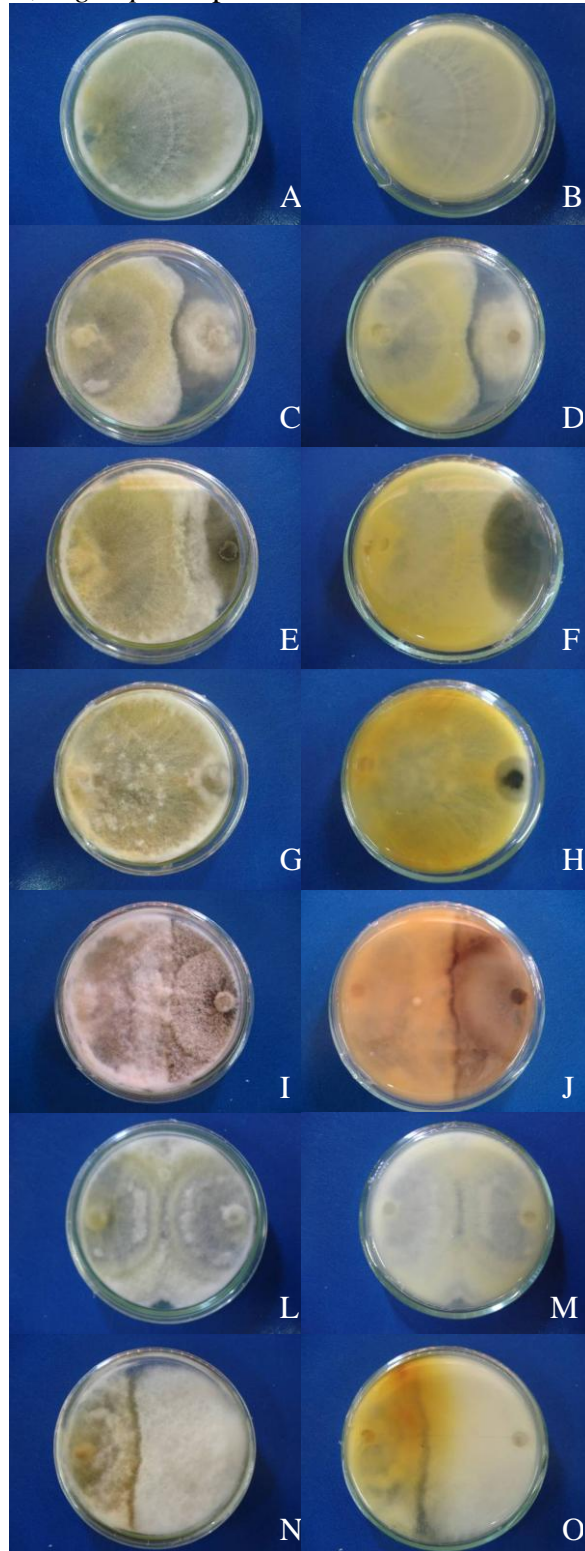
Fonte: (Autor, 2011)

6.3.4 Cultura pareada do fungo endofítico DeF2 isolado de *D.ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

A partir da análise da figura 25 A foi possível observar que o fungo DeF2, isolado de *D. ecastophyllum* conseguiu ocupar toda a placa de Petri, já que apresentou uma velocidade de crescimento superior ($0,92 \text{ cm.dia}^{-1}$) quando comparado com os fungos isolados de *A. cochliocarpos* que não ocuparam totalmente as placas em que se encontraram. Isto demonstra aptidão superior em ocupar substratos diferentes da planta hospedeira comparado com os demais fungos utilizados neste trabalho. A figura 25 C mostra que apesar da existência de um halo de inibição produzido pelo fungo *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* utilizado como antagonista ele ocupou um área visivelmente maior da placa neste cultivo pareado.

Já na figura 25 E, foi observado que além de ocupar uma área superior ao ocupado pelo fungo *Guignardia* sp., o fungo DeF2 ainda avançou suas hifas sobre a colônia deste fungo mostrando evidência de micoparasitismo. Quando cultivado na presença do fungo *Nigrospora* sp. não teve sua colônia invadida pelas hifas deste fungo, mas apresentou diferenciação no padrão da coloração do exsudado de cor amarelada, assim como na figura 25 F, H e J.

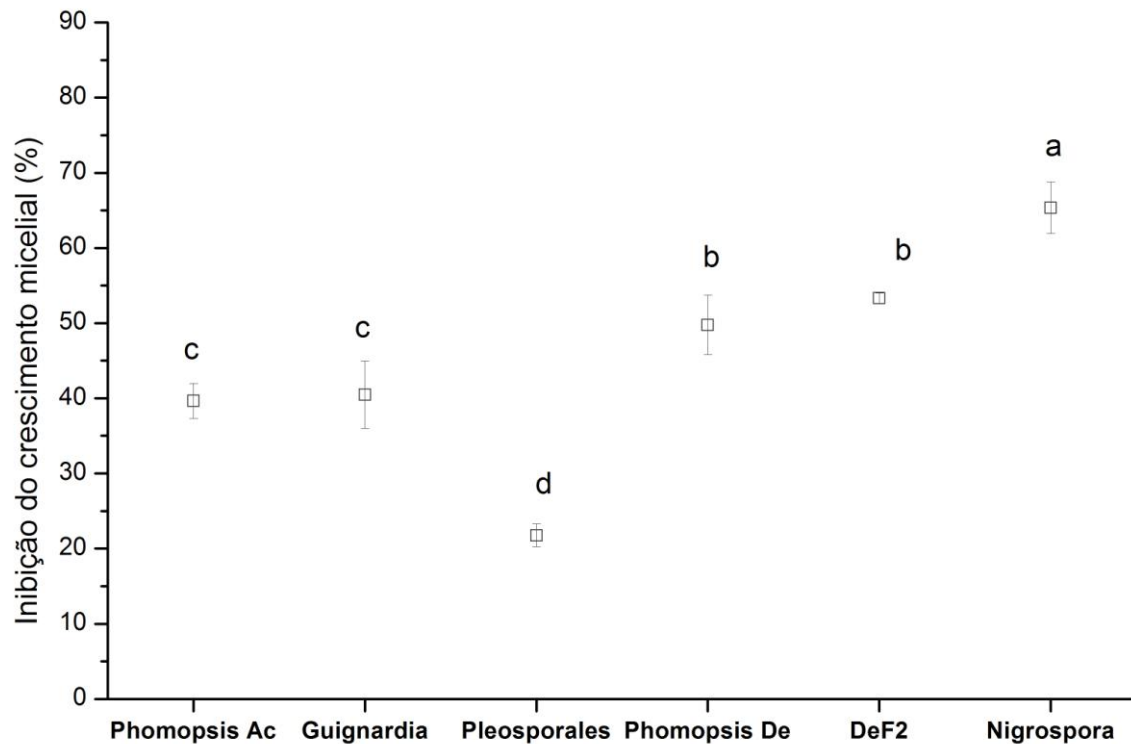
Figura 25- Cultura pareada do fungo DeF2 entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo DeF2 se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em L e M; a direita nas demais placas: *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* em C e D; *Guignardia* sp. em E e F; fungo da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos* em G e H; fungo *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* em I e J; *Nigrospora* sp. em N e O.



Fonte: (Autor, 2011)

A análise da figura 26 mostrou que o fungo *Nigrospora* sp. se apresentou como o antagonista mais eficiente comparado com todos os outros fungos endofíticos testados neste cultivo pareado com a porcentagem de inibição de 65,35 % que foi significativamente superior, por exemplo, ao do fungo da ordem Pleosporales que foi o antagonista com menor eficiência com 21,77% de inibição do crescimento do fungo endofítico DeF2.

Figura 26- Antagonismo entre o fungo DeF2 isolado de *D. ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras = desvio padrão; n = 4; Ac = isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.



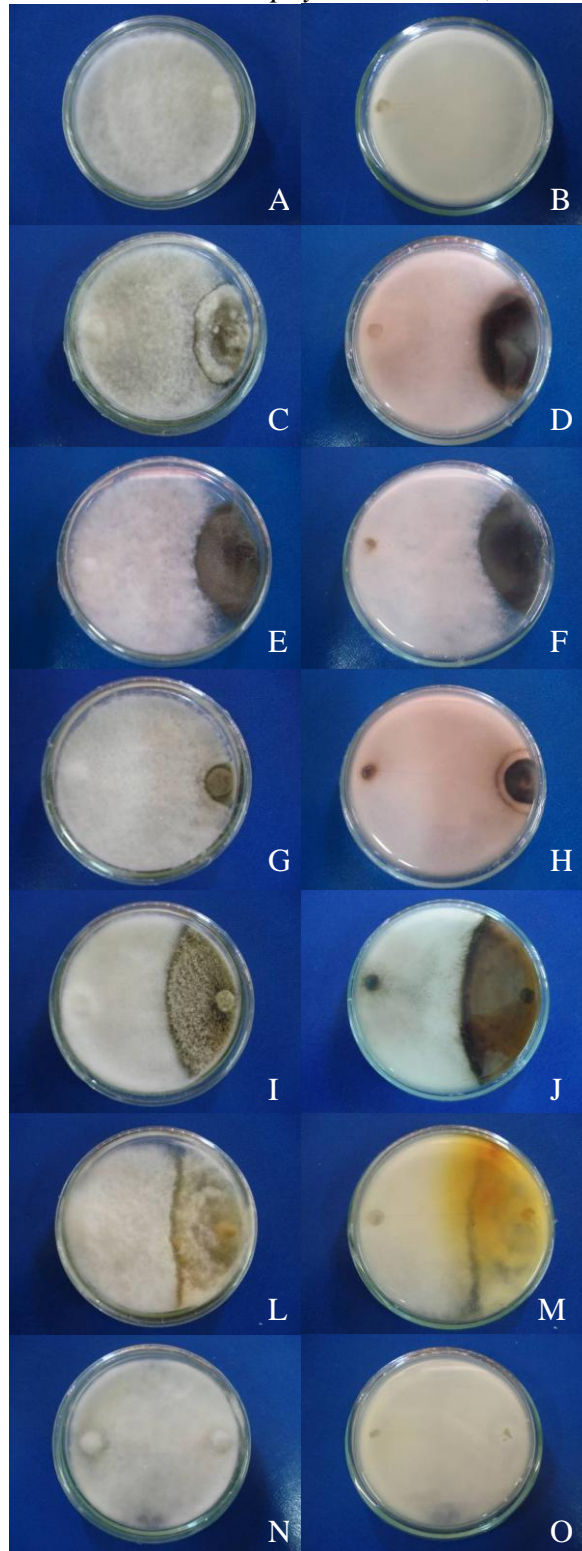
Fonte: (Autor, 2011)

6.3.5 Cultura pareada do fungo endofítico *Nigrospora* sp. (DeNs) isolado de *D. ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

A partir da análise da figura 27 A foi possível observar que o fungo *Nigrospora* sp.. isolado de *D. ecastophyllum* conseguiu ocupar toda a placa de Petri, já que apresentou uma velocidade de crescimento superior ($0,93 \text{ cm.dia}^{-1}$) quando comparado com os fungos isolados de *A. cochliocarpos* que não ocuparam totalmente as placas em que se encontraram. Isto demonstra aptidão em ocupar substratos diferentes da planta hospedeira comparado com os demais fungos utilizados neste trabalho. A figura 27 C e G mostrou que este fungo avança suas hifas sobre as colônias dos fungos *Phomopsis* sp.e do fungo da ordem Pleosporales isolados de *A. cochliocarpos*, respectivamente.

A mudança do padrão de cor dos exsudados para uma tonalidade rosa pode ser observado na figura 27 D e H quando em cultura pareada com *Phomopsis* sp.e do fungo da ordem Pleosporales isolados de *A. cochliocarpos*, respectivamente. Provavelmente, houve algum tipo de interação entre as colônias que provocou esta característica no padrão de com dos exsudados de *Nigrospora* sp. . Algo semelhante acontece na figura 27 M onde, desta vez, foi o fungo DeF2 que produziu de forma acentuada, na região de contato entre as colônias, exsudados de coloração amarelada quando em cultura pareada com o fungo *Nigrospora* sp.

Figura 27- Cultura pareada do fungo *Nigrospora* sp. (DeNs) entre os demais fungos endofíticos isolados. Placas de Petri com visão superior a esquerda e inferior a direita. O fungo *Nigrospora* sp. (DeNs) se encontra à esquerda em todas as placas de Petri e a direita em N e O; a direita nas demais placas: *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* em C e D; *Guignardia* sp. em E e F; fungo da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos* em G e H; fungo *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* em I e J; DeF2. em L e M.

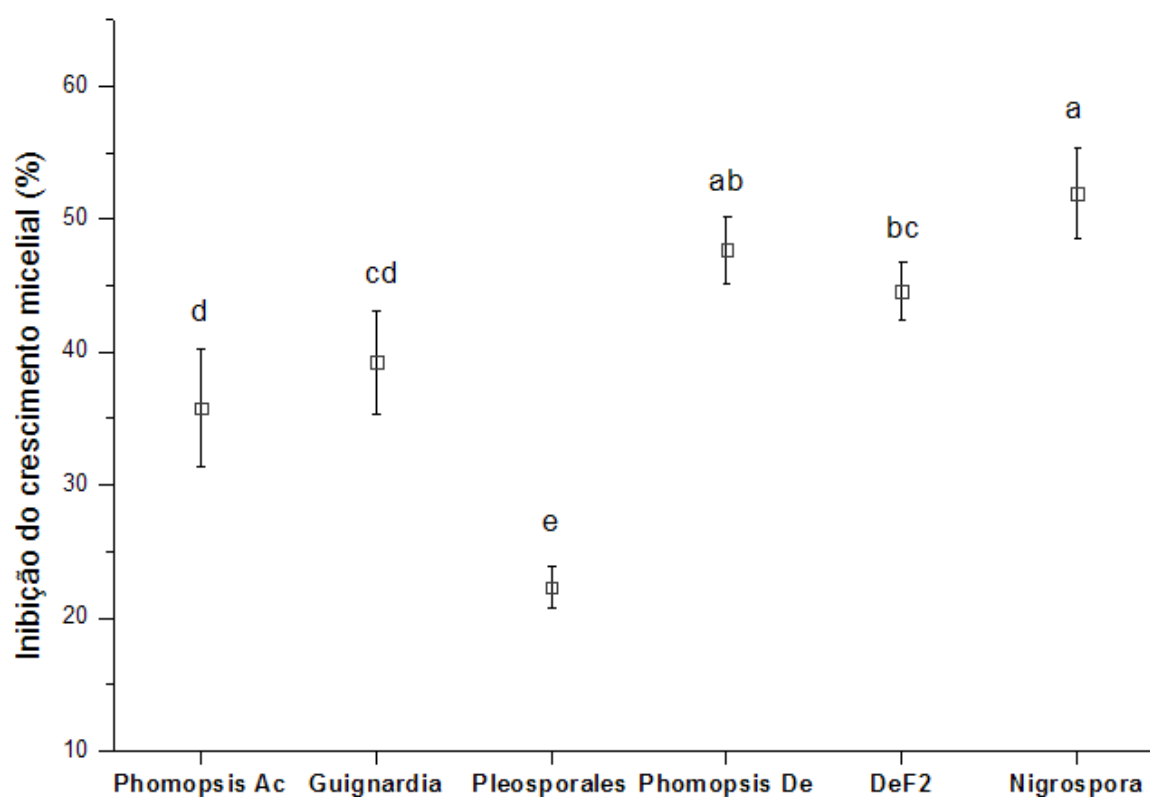


Fonte: (Autor, 2011)

A partir da análise da figura 28 foi possível observar que os antagonistas com menor eficiência foi o fungo da ordem Pleosporales isolado de *A. cochliocarpos*.

Em um ambiente de cultura pareada como o experimentado neste trabalho o fungo *Nigrospora* sp. seria um dos antagonistas mais eficientes quando comparado com os demais fungos isolado de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

Figura 28- Antagonismo entre o fungo *Nigrospora* sp. isolado de *D. ecastophyllum* e os demais fungos endofíticos isolados de *A.cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*. □=Média; Barras = desvio padrão; n = 4; Ac = isolado de *A. cochliocarpos*; De = isolado de *D. ecastophyllum*. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.



Fonte: (Autor, 2011)

6.4 Conclusão

A partir do experimento utilizando cultura pareada dos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum* foi possível concluir que:

Isolados provenientes do hospedeiro *D. ecastophyllum* praticamente foram antagonistas mais eficientes quando comparados com os isolados de *A. cochliocarpos*.

As estratégias utilizadas para sobrevivência *in vitro* em cultura pareada podem ser diferenciadas em um mesmo gênero de fungo como ocorreu com os dois isolados de *Phomopsis* sp.

7 PRODUÇÃO DE EXTRATOS A PARTIR DO MICÉLIO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *A. COCHLIOCARPOS* E *D. ECASTOPHYLLUM* E ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DESTES.

7.1 Introdução

Endofíticos fornecem uma variedade de produtos naturais únicos, estruturalmente bioativos, tais como alcalóides, benzopirranonas, Quinonas, flavonóides, ácidos fenólicos, quinonas, esteróides, terpenóides, tetralonas, xantonas e outros (Tan e Zou, 2001).

Antibióticos, compostos antivirais, os agentes anticancerígenos, produtos insecticidas, antidiabéticos, compostos imunossupressores, bem como os antioxidantes têm sido relatados de metabólitos endofíticos (Strobel et al. 2004), e as plantas medicinais têm sido reconhecidas como um repositório de endofíticos com novos metabólitos de importância farmacêutica (Strobel et al. 2004; Tan e Zou 2001; Wiyakrutta et al. , 2004).

As plantas medicinais contêm uma grande variedade de moléculas que combatem os radicais, tais como compostos fenólicos (por exemplo, ácidos fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas lignanas, lignina, estilbenos, e taninos), compostos de nitrogênio (por exemplo, os alcalóides e aminas), vitaminas, terpenos e outros metabólitos endógenos (Cai et al. 2004;Huang et al., 2001).

Plantas tradicionais da medicina chinesa têm sido utilizadas na confecção de produtos farmacêuticos e terapias alimentares por vários milênios (Cai et al. 2004; Tapiero et al. 2002). Compostos naturais isolados a partir destas plantas mediciais são uma rica fonte de novas drogas com múltiplas atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes. Tem havido muitos estudos sobre a atividade antioxidante de plantas medicinais (Re et al. 1999; Huang et al., 2001).

Cai et al. (2004) relataram que os compostos fenólicos foram componentes antioxidantes dominantes em 112 plantas medicinais da medicina tradicional Chinesa associadas à luta contra o câncer, e resultados semelhantes foram relatados para 133 plantas medicinais indianas (Surveswaran et al. 2007), com ambos os estudos mostrando correlação linear positiva altamente significativa entre o total da capacidade antioxidante e compostos fenólicos. Apesar de numerosos estudos sobre a atividade antioxidante e compostos fenólicos nas plantas, no entanto, nenhuma investigação comparativa foi realizada para sua endofíticos.

Há evidências crescentes indicando que espécies reativas de oxigênio (ERO, por exemplo, O_2^- e OH) e reações de radicais livres podem causar danos oxidativos a

biomoléculas (por exemplo, proteínas, lipídeos, e *DNA*), acabam contribuindo para, por exemplo, envelhecimento, câncer, diabetes, doença de Alzheimer, e outras doenças neurodegenerativas (Finkel e Holbrook 2000; Halliwell, 1994). Antioxidantes são apontados como substâncias altamente eficazes na gestão das deficiências dos tecidos de espécies reativas de oxigênio. Muitos compostos antioxidantes possuem, também, efeitos equivalentes a antiinflamatórios, antiateroscleróticos, antitumorais, antimutagênicos, anticarcinogênicos, antibacterianas, ou atividades antivirais (Cozma 2004; Halliwell 1994; Mitscher et al. 1996, Owen et al. 2000; Sala et al., 2002).

Antioxidantes derivados de produtos naturais têm recebido muita atenção nos últimos anos (Hu e São Cristóvão 2000; Schulz et al. , 2002). Endofíticos poderiam ser uma fonte potencial de novos produtos naturais para usos medicinais, agrícolas e industriais. Muita atenção tem sido dada a biodiversidade endofítica, a química e bioatividade dos metabólitos endofíticos, e as relações entre endofíticos e plantas hospedeiras (Schulz et al. 2002; Tan e Zou, 2001).

Os objetivos deste capítulo são: a produção de extratos a partir da biomassa dos fungos endofíticos de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum* e avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Preparação dos meios de cultura na produção de biomassa dos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

No experimento sobre o efeito da agitação do meio de cultura na produção de biomassa dos fungos endofíticos isolados foi utilizado o meio de cultura como descrito por Menezes e Silva-Hanlin (1997) e modificados como mostrado a seguir:

- Meio Batata-Dextrose (BD)

O meio de cultura BD foi preparado utilizando batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) descascada e cortada em rodela a 20% (p/v), glicose a 2% (p/v) e água destilada. A batata foi cozida em bécker com metade do volume final de água destilada por 30 minutos. Em seguida, foi filtrada através de algodão ou papel filtro. A glicose foi adicionada ao líquido filtrado e o volume final da solução completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8. Finalmente, foi vertido 100 mL do meio de cultura em erlenmeyers de 250 mL, tampado com folhas duplas de papel alumínio e esterilizados em autoclave à pressão de 1Kg.F.cm⁻² e 121°C de temperatura durante 20 minutos.

Após o processo de esterilização, em ambiente estéril, os erlenmeyers foram vedados com filme plástico e então permaneceram armazenadas por pelo menos 2 dias em ambiente de laboratório e foram analisadas visualmente quanto a contaminação momentos antes da condução do experimento.

7.2.2 Efeito da agitação do meio de cultura na produção de biomassa.

O experimento foi conduzido em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL meio de cultura BD como descrito anteriormente. No interior de cada erlenmeyers foi introduzido um disco de 0,6 cm de uma cultura com 7 dias de cada fungo endofítico isolado. Os erlenmeyers foram vedados com filme plástico, identificados e encaminhados através de sorteio para um agitador orbital a 150 rpm ,ou, de outra forma, para uma bancada onde ficaram de forma estática por um período de 30 dias. O experimento foi realizado na ausência de luz e foram utilizados 20 erlenmeyers em cada ambiente totalizando 40 erlenmeyers neste

experimento.

7.2.3 Análise estatística.

Neste experimento foi utilizado um delineamento interamente casualizado composto por 2 tratamentos (meios agitados e estáticos) com 20 repetições cada. A parcela experimental foi representada pela massa seca, em estufa a 60°C até atingir massa constante, do micélio contido em cada erlenmeyer.

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita através de análise de variância pelo teste F de Snedecor inicialmente e para as médias obtidas foi utilizado o teste de Tukey a 1% de probabilidade. As Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico ESTAT – Sistema para análises estatísticas 2.0 do Polo Computacional/Depto. De Ciências Exatas-UNESP-FCAU-Campus de Jaboticabal.

7.2.4 Preparação dos extratos produzidos pelos fungos endofíticos.

A partir das massas fúngicas produzidas pelos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum* foram obtidos os extratos através de maceração e utilização de solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol). Finalmente os extratos obtidos foram concentrados em rotoevaporador e mantidos em frascos do tipo penicilina até o momento das análises.

7.2.5 Avaliação qualitativa da presença de alcalóides e compostos fenólicos.

Alíquotas de cada extrato foram aplicadas, em triplicata, em placas de sílica gel com auxílio de um capilar. Após a eliminação do solvente a temperatura ambiente, foram aplicados o reagente de Dragendorff, para a revelação de alcalóides, e o reagente cloreto férrico, para a revelação de compostos fenólicos.

7.2.6 Avaliação Qualitativa do Potencial Antioxidante

Para avaliação do potencial antioxidante (frente ao radical sintético DPPH), alíquotas dos extratos em n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol foram aplicadas

individualmente em cromatoplasmas (gel de sílica, Merck) adequados. Após eliminação do solvente a temperatura ambiente as cromatoplasmas foram submersas, durante 10 segundos, em solução metanólica 0,4 mM do radical sintético DPPH. Após secagem dos cromatogramas a temperatura ambiente, o aparecimento de manchas esbranquiçadas sob um fundo violeta sugeriu a atividade antioxidante.

7.2.7 Avaliação Quantitativa do Potencial Antioxidante dos extratos obtidos dos fungos endofíticos isolados.

O método utilizado para avaliação quantitativa do potencial antioxidante foi descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) e Sánchez-Moreno *et al.* (1998), no qual a substância ou extrato cuja atividade antioxidante deseja-se avaliar, reage com o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) em solução metanólica. O consumo do radical é monitorado pelo decréscimo da absorvância do radical DPPH em espectrofotômetro UV-VIS, em comprimento de onda de 515 nm.

7.2.8 Preparo das Soluções e Construção da Curva de Calibração do DPPH

Foi preparada solução estoque de DPPH 24 mg.L⁻¹ (~0,06 mmol.L⁻¹), mediante solubilização do radical em metanol (grau CLAE, TEDIA). O balão contendo a solução foi protegido contra a ação da luz com papel alumínio e mantido sob refrigeração. A partir dessa solução, foram preparadas as diluições (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µmol.L⁻¹) necessárias para a construção da curva de calibração do DPPH.

A curva de calibração foi construída a partir dos valores de absorvância da radiação UV a 515 nm de todas as soluções do DPPH (0 a 60 µmol.L⁻¹), medidas em cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm. Utilizou-se metanol como “branco” e 1 mL de cada solução do DPPH. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata. Após obtenção dos valores de absorvância, determinou-se, através de regressão linear através do programa OriginPro 8 SR0 v 8.0724 (B724)., a equação matemática da curva de calibração ($Y = a.X + b$, onde: a = coeficiente angular ou inclinação da reta; b = coeficiente linear).

7.2.9 Preparo das Amostras e Determinação de CI_{50}

As soluções estoque das amostras (extratos), nas concentrações indicadas na tabela 17, foram preparadas a partir da solubilização de cada amostra em metanol (grau CLAE). Misturas reacionais constituídas por 0,1 mL da solução teste e 0,9 mL da solução estoque de DPPH 24 mg/mL (~0,06 mmol/L) foram preparadas e as medidas de absorbância de cada uma foram feitas a 515 nm, em triplicata a cada 5 minutos, durante 1 hora.

Substituindo-se Y da curva de calibração do DPPH ($Y = a.X + b$) pela média dos valores de absorbância no tempo de 30 minutos para cada concentração testada, foi possível determinar X, que corresponde aos percentuais de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}).

A CI_{50} representa a concentração da solução teste, necessária para diminuir a concentração do radical DPPH em 50 %. Esse parâmetro foi determinado a partir de uma equação linear obtida pela relação entre as concentrações das soluções (Tabela 17) *versus* a percentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}), através do programa Origin 8 SR0 v 8.0724 (B724).

Tabela 17- Concentrações utilizadas dos extratos dos fungos endofíticos para determinação da CI_{50} .

Fungo	Hexano ($g.mL^{-1}$)				
AcF1	0	0,0029	0,0058	0,0087	0,0116
AcF2	0	0,0027	0,0055	0,0082	0,0109
AcF3	0	0,0037	0,0074	0,0110	0,0147
DeF1	0	0,0034	0,0067	0,0101	0,0134
DeF2	0	0,0035	0,0070	0,0105	0,0140
DeNs	0	0,0030	0,0059	0,0089	0,0118
Clorofórmio ($g.mL^{-1}$)					
AcF1	0	0,0027	0,0054	0,0080	0,0107
AcF2	0	0,0029	0,0059	0,0088	0,0117
AcF3	0	0,0032	0,0065	0,0097	0,0129
DeF1	0	0,0025	0,0050	0,0075	0,0100
DeF2	0	0,0025	0,0051	0,0076	0,0101
DeNs	0	0,0026	0,0052	0,0078	0,0104
Acetato de etila ($g.mL^{-1}$)					
AcF1	0	0,0026	0,0052	0,0077	0,0103
AcF2	0	0,0033	0,0066	0,0098	0,0131
AcF3	0	0,0310	0,0620	0,0930	0,124
DeF1	0	0,0026	0,0052	0,0077	0,0103
DeF2	0	0,0028	0,0056	0,0084	0,0112
DeNs	0	0,0029	0,0057	0,0086	0,0114
Metanol ($g.mL^{-1}$)					
AcF1	0	0,0030	0,0060	0,0089	0,0119
AcF2	0	0,0027	0,0053	0,0080	0,0106
AcF3	0	0,0031	0,0062	0,0092	0,0123
DeF1	0	0,0026	0,0052	0,0078	0,0104
DeF2	0	0,0029	0,0057	0,0086	0,0114
DeNs	0	0,0028	0,0056	0,0084	0,0112

Fonte: (Autor, 2011)

7.3 Resultados e discussão

A partir da massa seca dos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum* foi possível obter os resultados para a produção de biomassa em meio de cultura estático ou agitado. A tabela 18 mostra que para os fungos *Phomopsis* sp. isolado de *A. cochliocarpos* e *Guignardia* sp. a produção de biomassa se mostrou indiferente aos estados agitado e estático em que o meio foi submetido, já para os demais fungos a agitação do meio de cultura teve um incremento significativo comparado ao estado estático.

Tabela 18- Efeito da agitação do meio de cultura sobre a matéria seca (g) dos fungos endofíticos isolados de *Abarema cochliocarpos* e *Dalbergia ecastophyllum*.

Fungo	Estado	
	Estático*	Agitado*
<i>Phomopsis</i> sp.(AcF1)	0,3008 a	0,2727 a
<i>Guignardia</i> sp.(AcF2)	0,7222 a	0,7093 a
Fungo da ordem Pleosporales (AcF3)	0,9060 b	0,9747 a
<i>Phomopsis</i> sp. (DeF1)	0,2988 b	0,5127 a
DeF2	0,2538 b	0,4805 a
<i>Nigrospora</i> sp.(DeNs)	0,2611 b	0,3295 a

* Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não possuem diferença estatística a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O rendimento total dos extratos não ultrapassou 30% da massa seca dos micélios dos fungos endofíticos isolados e dentre todos os fungos *Nigrospora* sp. foi que apresentou o menor rendimento (8,45%) (Tabela 19).

Os extratos metanólicos de dois fungos, o *Guignardia* sp. e o fungo da ordem Pleosporales, no momento em que foram concentrados apresentaram a formação de precipitados de coloração branca pouco solúveis em solvente metanol. Esses precipitados foram purificados e estão sendo analisados.

Tabela 19-Massa seca e rendimento dos extratos obtidos pela ação de solventes de diferentes polaridades sobre a biomassa dos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

Isolado/Massa seca (g)	Solvente	Massa seca (g)	Rendimento (%)
<i>Phomopsis</i> sp. (AcF1)/ 10,456g	Hexano	0,8008	7,66
	Clorofórmio	0,5721	5,47
	Acetato de etila	0,1456	1,39
	Metanol	0,3248	3,11
Total			17,63
<i>Guignardia</i> sp. (AcF2)/ 29,880g	Hexano	2,919	9,77
	Clorofórmio	0,8037	2,69
	Acetato de etila	0,6057	2,03
	Metanol	1,5702	5,25
Total			19,74
<i>Pleosporales</i> sp. (AcF3)/ 27,72g	Hexano	2,7214	9,82
	Clorofórmio	0,8517	3,07
	Acetato de etila	0,4261	1,54
	Metanol	0,8057	2,91
Total			17,34
<i>Phomopsis</i> sp. (DeF1)/ 15,39g	Hexano	1,2825	8,33
	Clorofórmio	0,2706	1,76
	Acetato de etila	0,2333	1,52
	Metanol	0,6084	3,95
Total			15,56
DeF2/ 23,08g	Hexano	3,3898	14,68
	Clorofórmio	0,7791	3,38
	Acetato de etila	0,3207	1,39
	Metanol	1,3832	5,99
Total			25,44
<i>Nigrospora</i> sp. (DeNs)/ 12,78g	Hexano	0,1831	1,43
	Clorofórmio	0,1293	1,01
	Acetato de etila	0,3551	2,78
	Metanol	0,4129	3,23
Total			8,45

Fonte: (Autor, 2011)

A partir dos extratos clorofórmico e hexânico, foi possível observar a presença tanto de alcalóides quanto de compostos fenólicos. Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal. Diversos extratos de ervas como alecrim, coentro, sálvia, tomilho e manjeriço têm sido estudados devido o poder antioxidante, que pode ser atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos (WETTASINGHE et al., 1999).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI et al., 1995).

Ge et al. (2008) isolaram um endofítico do gênero *Penicillium* sp., de cuja cultura foram extraídos três alcalóides com propriedades citotóxicas contra algumas linhagens de células cancerígenas.

Tabela 20.- Análise qualitativa da presença de alcalóides e compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos dos fungos endofíticos isolados.

Isolado	Alcalóides				Compostos fenólicos			
	Hexano	Clorofórmio	Acetato de etila	Metanol	Hexano	Clorofórmio	Acetato de etila	Metanol
AcF1	x	x	-	-	x	x	-	-
AcF2	x	x	-	-	x	x	-	-
AcF3	x	x	-	-	x	x	-	-
DeF1	x	x	-	-	x	x	-	-
DeF2	x	x	-	-	x	x	-	-
DeNs	x	x	-	-	x	x	-	-

x : positivo para a presença do composto no extrato; - : negativo para a presença do composto no extrato.

O fungo *Phomopsis* sp. isolado de *D. ecastophyllum* foi que apresentou 3 extratos com maiores capacidades antioxidante dentre os demais fungos. Os extratos clorofórmico, acetato de etila e metanólico apresentaram 37,82%, 32,85 e 39,86 % de atividade antioxidante como mostrado na tabela 21.

O fungo *Phomopsis* sp. isolado de *A.cochliocarpos* apresentou menor atividade antioxidante do que apresentou o isolado de *D. ecastophyllum*, principalmente no extrato

clorofórmico (4,17%)

Tabela 21- Porcentagem de atividade antioxidante (AA%) dos controles e dos extratos obtidos a partir de solvente de diferentes polaridades da biomassa seca dos fungos endofíticos isolados de *A. cochliocarpos* e *D. ecastophyllum*.

Fungo	AA%			
	Hexano	Clorofórmio	Acetato de Etila	Metanol
AcF1	3,01	4,17	20,23	20,35
AcF2	3,01	3,48	8,11	0,72
AcF3	2,06	2,37	7,99	17,34
DeF1	0,47	37,82	32,08	39,86
DeF2	3,11	16,61	17,98	19,79
DeNs	2,22	3,01	9,84	5,70
Ac. Ascórbico	-	-	-	98,62
BHT	-	-	-	95,14

Fonte: (Autor, 2011)

Os Fungos *Guignardia* sp. (AcF2) e *Nigrospora* sp. (DeNs) apresentaram os menores resultado em praticamente todos os extrato quando comparados com os demais fungos isolados (Tabela 21).

7.4 Conclusão

A partir dos resultados dos experimentos de produção de biomassa e de atividade antioxidante dos extratos pode-se concluir que:

A produção de biomassa é incrementada quando o meio de cultura BD é agitado na maioria dos fungos testados, não acontecendo com o fungo *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp, isolados de *A. cochliocarpos*.

O gênero *Phomopsis* apresentou extratos com atividade antioxidante superior ao observado nos extratos dos demais fungos.

REFERÊNCIAS

- AKELLO, J. Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. **Crop Protection**. p. 1–5, 2008.
- AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagonística de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 24, n.2, p.565-568, 2002.
- APPLIED BIOSYSTEMS. 2002. Precipitation method to remove unincorporated dye terminators from ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Reactions. Disponível em http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms/041276.pdf. Acesso em 25 jun. 2008.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Performing DNA sequencing reactions, Section 3, p.2-6. In: Automated DNA Sequencing – Chemistry Guide, 2000.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**. v. 22, n.2,p. 225-229, 1999.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology** [online]. 15 Abril 2000, v..3, n.1 [citado em 20 Abril 2000]. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4>>. ISSN: 0717-3458.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In Ecologia microbiana (I.S. Melo e J.L. Azevedo, coords.). Editora Embrapa, CNPMA, Jaguariuna. 1998, p.117-137.
- BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; MACCHERONI, W.; De BLANCO, C.G.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**. v.92, p.464-477, 2002.
- BACON, C. W.; HINTON, D. M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: ASM Press, p. 413-421, 1997.
- BARBOSA, M. A. G. et al. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, p. 98-104, 2001.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**. v. 72, p.379-382, 1982.
- BILLS, G. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes**. v. 2, p. 165-194, 2002.
- BODDY, L.; GRIFFITH, G. S. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. **Sydowia**, v. 41, p. 41-73, 1989.
- BORGES, W. de S.; PUPO, M. T. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia*

- (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 17, n. 5, p. 929-934, 2006.
- BRADY, S.F.; CLARDY, J. CR377, A new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**. v.63, p.1447-1448, 2000.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.
- BRAYFORD, D. Vegetative incompatibility in *Phomopsis* from elm. **Mycological Research**, v. 94. n. 6, p. 745-752, 1990.
- BRAZ-Fº, R. Química de Produtos Naturais. Importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Química Nova**. v. 17, p.405, 1994.
- BUSSABAN, B. et al. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 943-948, 2001.
- CALATAYUD, V.; SANZ, M.J.; APTROOT, A.. *Lichenopyrenis galligena* (Pleomassariaceae), a new genus of gall-forming lichenicolous fungi on *Leptochidium*. **Mycological Research**. v.105, p. 634–637, 2001.
- CÂMARA, M.P.S.; PALM, M.E; BERKUM, P.; VAN O'NEILL, N.R. Molecular phylogeny of *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria*. **Mycologia**. v. 94, p.630–640. 2002.
- CAMATTI-SARTORI, V. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchard subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**. v. 45, n.5, p. 397-402, 2005.
- CARROL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**. v. 69, p. 2-9, 1988.
- CARROLL, G. C. The Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEAVEL, J. Van Der (Eds.). *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1986. p. 205-222.
- CHOMCHEON, P. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. **Phytochemistry**. v. 70, p.407–413, 2009.
- COELHO, A. R. et al. *Penicillium expansum* versus Antagonist Yeasts and Patulin Degradation *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 50, n.4, p. 725-733, 2007.
- CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**. v. 44, n.2, p. 157-160, 2004.
- CRAGG, G.M.;NEWMAN, D.J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**. v.77, n.1, p.7-24, 2005.
- CÚNDOM, M. A.; MAZZA, S. M.; GUTIÉRREZ, S. A. Short communication. Selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural**

Research. v.1, n.4, p.79-82, 2003.

DAISY, B. H. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology.** v. 148, p. 3737-3741, 2002.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K.. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin **eCAM.** V.5, n.4, p.435–441, 2008.

De MARCO, J.L.; LIMA, L.H.C.; SOUSA, M.V.; De FELIX, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v.16, p.383-386, 2000.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology.** v. 52, p.455-463, 1999.

DUIJFF, B.J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist.** v.135, p. 325-334, 1997.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural.** v.31, n.5, p. 885-887, 2001.

ETHUR, L.Z. *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira.** v. 30, p.127-133, 2005.

FARR, D. F.; CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y., Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. **Mycologia,** v. 94, n. 3, p. 494- 504, 2002.

FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and development modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology.** v. 96, p. 928-936, 1991.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biociência e Desenvolvimento.** n. 14, p.12-16, 2000.

GALLO, M. B. C. et al. Atividade citotóxica de extratos de fungos endofíticos isolados de *Smallanthus sonchifolius*. **Revista Brasileira de Biociências.** v. 5, n.2, p. 402-404, 2007.

GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timbertree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica.** v. 33, n.2, p. 352–360, 2001.

GANGADEVI, V.; MURUGAN, M.; MUTHUMARY, J. Taxol determination from *Pestalotiopsis pauciseta*, a fungal endophyte of a medicinal plant. **Chinese Journal of Biotechnology.** v. 24, n.8, p.1433-1438, 2008.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 24, n.5, p. 717-724, 2008.

GAO, X. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax*

- japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**. v. 249, p. 255–266, 2005.
- GE, H. M. et al. Penicidones A–C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, v.69, p. 571–576, 2008.
- GHADIN, N. et al. Isolation and characterization of a new endophytic *Streptomyces* SUK 06 with antimicrobial activity from malaysian plant. **Asian Journal of Plant Sciences**. v. 7, n. 2, p.189-194, 2008.
- GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A. V.; AZEVEDO, J.L. Genetics variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.2, p.251- 255, 2002.
- GOMES, N. S. B.; AUER, C. G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**. v.43, p. 123-138, 2001.
- GONG, L. J.; GUO, S. X. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n.5, p. 731-736, 2009.
- HANLIN, R. T.; MENEZES, M. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE. Recife-PE. 1996. 274p.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revised. **Mycological Research**. v. 105, p.1422-1431, 2001.
- HUANG, W. et al. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botany**. v. 61, n.1, p. 14-30, 2007.
- HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**.v. 33, p. 61–75, 2008.
- HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; XING, J.; CORK, H. A potential Antioxidant Resource: Endophytic Fungi from Medicinal Plants. **Economic Botany**. v.61, n.1, p.14-30, 2007.
- HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.. ZHENG, Z.; SU, W. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 31, p. 163-167, 2001.
- JOHNSON, J. A.; WHITNEY, N. J. Isolation of fungal endophytes from black spruce (*Picea mariana*) dormant buds and needles from new brunswick, Canada. **Canadian Journal Botany**.v.70, n.9, p. 1754-1757, 1992.
- KAMEI, S. H. **Identificação molecular de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais do Estado de Alagoas**. Monografia de TCC. Maceió. 2008. Universidade Federal de Alagoas.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial Activities of Aphidicolin and its Semisynthetic Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n.1, p.:288-292, 2001.
- KIERAN, P.M.; MACLOUGHLIN, P.F.; MALONE, D.M. Plant cell suspension cultures: som

engineering considerations. **Journal of Biotechnology**. v.1-2, n.59, p. 39-52, 1997.

KODSUEB, R.; JEEWON, R.; VIJAYKRISHNA, D.; MCKENZIE, E.H.C.; LUMYONG, P.; LUMYONG, S.; HYDE, K.D. Systematic revision of *Tubeufiaceae* based on morphological and molecular data. **Fungal Diversity**. v. 21, p.105–130, 2008.

KROHN, K. et al. Biologically active metabolites from fungi. Part 16: New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, crystal structure analysis and 104 determination of absolute configuration by CD calculations. **Tetrahedron**. v.57, p. 4343-4348, 2001.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos **Fitopatologia brasileira**. v.28, n.3, p.251-257, 2003.

LEE, J. C. et al. Subglutinol A&B: immunosuppressive compounds from endophytic fungus – *Fusarium subglutinans*. **Journal of Organic Chemistry**. v. 60, p. 7076-7077, 1995.

LI, H.. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 21, p.1515– 1519, 2005.

LI, J. Y.. The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. From *Torreya grandifolia*. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 20, p. 259-264, 1998.

LI, Y. C. Interactions of Taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during Taxol accumulation. **Cell Biology International**. v. 33, p.106-112, 2009.

LINHARES, A. I.; MATSUMURA, A. T. S.; LUZ, V. C. Amplitude de ação antagonista de microrganismos epífitas do trigo sobre o crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 1, n.3, p. 119-126, 1995.

LISBOA, B. B. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**. v.37, n.5, p. 1255-1260, 2007.

LU, H. et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**. v. 151, p. 67-73, 2000.

MAGALHÃES, A. A. da S. **Isoalmento e variabilidade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus sucuuba* Spruce (Wood) Apocynaceae**. São Carlos, 2001. 130p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao*)**. Piracicaba, 2006. 127p. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 2006.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.1, p.369-409, 1993.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A

- Verticillium dahliae* KLEB. **Science agriculture**.v.55, n.1, 1998.
- MELLO, S. C. M. Antagonistic process of *Dicyma pulvinata* against *Fusicladium macrosporum* on rubber tree. **Tropical Plant Pathology**. v. 33, n. 1, p. 5-11, 2008.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Jaguarauína: **Embrapa Meio Ambiente**, 1998, v. 1, 262 p.
- MELO, I. S.; FAULL, J. L.; Nascimento, R. S. Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 417-419, 2006.
- MENEZES, M.; SILVA-HANLIN. **Guia Prático para fungos fitopatogênicos**. Imprensa Universitária, UFRPE, 1997, 106p.
- MIYAZAKI, Y. . Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Journal Clinical Microbiology**. v.31, p. 2228-2232, 1993.
- MONTEALEGRE, J. R. Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional effect of solarization. **Journal of Biotechnology**. v.8, n.3, p. 250-257, 2005.
- MOREIRA, L. M. Controle em pós colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**. v.27, n.4, p. 395-398, 2002.
- MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) **Ciência e Agrotecnologia**. v. 23, n.2, p. 281-288, 1999.
- NAIK, B. S.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y. L. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. **Fungal Ecology**. p.1-5, 2008.
- NIH. NIAID global health research plan for HIV/AIDS, malaria and tuberculosis. US Department of Health and Human Services. Bethesda, Md. 2001.
- PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied Microbiology**. v.44, p.1-68, 1997.
- PEIXOTO NETO, P. A. de S.. Microrganismos Endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociência**, n.29, Ano 5, p.62-76 Novembro/Dezembro 2002.
- PENNA, E.B. da S. **Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis*, ST.HIL.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. Por RAPD**. Curitiba, 2000. 123 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J. e HIRANO, S. S. eds. **Microbial ecology of leaves**. New York: Spring-Verlag, p.179-197, 1991.
- PHILLIPS, A. J. L. **The plant pathogenic genus *Phomopsis* and its teleomorph (*Diaporthe*): Development and application of morphological, biological and phylogenetic species concepts**. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/personal_web_page.htm> Acesso em Dezembro de 2006.

PHONGPAICHIT, S. et al. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 48, p. 367–372, 2006.

PILEGGI, M. et al. Ação antimicrobiana e interação endofítica em *Symphytum officinale* L. **Biological and Health Sciences**. v. 8, n.1, p. 47-55, 2002.

PIMM, S. L.; RUSSELL, G.J., GITTLEMA, J.L.; BROOKS, T.M. The future of biodiversity. **Science**. v.269, p.347-350, 1995.

PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Sciences**. v. 4, n.5, p. 330-337, 2008.

QIN, J. et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, p. 1572–1574, 2009.

REHNER, S. A., UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botanic**, v. 72. p.1666-1674, 1994.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**.v. 13, n.3, p. 31-36, 2007.

ROCHA, R. et al. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, p.73-78, 2009.

ROCHA, R. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, p.73-78, 2009.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**. v. 40, n. 4, p. 261-267, 2000.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, K.F.; DRANDAROV, K.; HEERKLOTZ, J.; HESSE, M.; WERNER, C. Guignardia Acid, a Novel Type of Secondary Metabolite Produced by the Endophytic fungus *Guignardia* sp.: Isolation, Structure Elucidation, and Asymmetric Synthesis. **Helvetica Chimica Acta**, v.84, p.3766-3772, 2001.

RUBINI, M. R. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. **International Journal of Biological Sciences**. v.1, p. 24-33, 2005.

RUDGERS, J. A.; SWAFFORD, A. L. Benefits of a fungal endophyte in *Elymus virginicus* decline under drought stress. **Basic and Applied Ecology**. v. 10, p. 43–51, 2009.

SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.; BILLS, G.F.; ZABALGOGEAZCOA, I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. **Fungal Diversity**. v. 33,

p.87–100, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276. 1998.

SANTOS, L. S. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta Daninha**. v. 26, n.3, p. 539-548, 2008.

SANTOS, S. C. ; FERREIRA, F. S. ; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.17, n.2, p.: 215-219, Abr./Jun. 2007.

SCHULTZ, B.; BOYLE, C. the endophytic continuum. **Mycological Research**. v.109, n.6, p.661-686, 2005.

SHAHIDI, F; NACZK M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster. **Technomic**, 1995.

SHRESTHA, K. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of *Himalayan yew* of Nepal. **Planta Medicinal**. v. 67, p. 374-376, 2001.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in Forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**. v.21, p.75-89, 2007.

SIKORA, R. A. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**. v. 46, p. 15–23, 2008.

SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R. E.; MELO, I. S.; Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**. v.29, p. 395-399, 1999.

SILVA, G. H. et al. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal Brazilian of Chemical Society**. v.16, n.6B, p. 1463-1466, 2005.

SILVA, K. S. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**. v.29, n.4, p.749-754, 2008.

SILVA, M. S. da; ANTONIOLLI, A. R.; BATISTA, J. S.; MOTA, C. N. da. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta bot. bras**. v.20, n.4 p.815-829. 2006.

SILVA, R. E. A. da. Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos e actinobactérias endofíticos isolados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (rabo-de-raposa). **Revista de Biologia Neotropical**. v. 3, n.2, p. 181-182, 2006b.

SILVA, R. L. de O. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, n.3, p. 649-655, 2006a.

SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs**. Germany: J.Cramer,

1984. 701p.

SMITH, V.L.; WILCOX, W.F.; HARMAN, G.E. Potential for biological control of Phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. **Phytopathology**. v.80, n.9, p.880-885, 1990.

SOARES, C. M. C. **Pau-brasil: a árvore nacional**. 2ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco/Estação Ecológica de Tapacurá. 1985.

SOARES, G.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SATO, H. Interação de leveduras “killer” com fungos patogênicos de citros. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA , 23, 2000. Botucatu. Resumos, Botucatu, 2000. 1 CD-ROM.

SOLOMON, P.S.; LOWE, R.G.T.; TAN, K.C.; WATERS, O.D.C.; OLIVER, R.P. *Stagonospora nodorum*: cause of stagonospora nodorum blotch of wheat. **Molecular Plant Pathology**. v. 7, p.147–156, 2006.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 9, p. 1315- 1324, 1995.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de isolados do fungo *Guignardia* sp por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS**. Curitiba, 2004. Dissertação de Mestrado- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

STROBEL, G. A. e LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society of Microbiology News**. v. 64, p. 263-268, 1998.

STROBEL, G. A. et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**. v. 145, p. 1991-1926, 1999b.

STROBEL, G. A. *Pestalotiopsis guenpinii*, a taxol-producing endophyte of the *Wollemi pine*, *Wollemia nobilis*. **Australian Journal of Botany**. v. 45, p. 1073-1082, 1997.

STROBEL, G. A. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System. **Applied Microbiology**. v. 22, p 426-433,1999a.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**. v. 67, p.257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG, P. C. W.; CHAU, R. M. W. Isopoestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, p. 179-183, 2002.

STROBEL, G. L. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and infection**. v. 5, p.534-535, 2003.

STROBEL, G.A.; HESS,W.M.; FORD, E.; SIDHU, R.S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. v. 17, p.417-423, 1996.

- SUTO, M. TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 93, n.1, p. 88-90, 2002.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**. v. 18, p 448-459, 2001.
- TANAKA, K.; HARADA, Y. Pleosporales in Japan (1): the genus *Lophiostoma*. **Mycosciense**. v.44, p. 85-96, 2003.
- TAO, G.; LIU, Z.Y.; HYDE, K.D.; LUI, X.Z.; YU, Z.N.. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (*Orchidaceae*). **Fungal Diversity**. v. 33, p.101–122, 2008.
- TAYUNG, K.; JHA, D. K. Antimicrobial evaluation of some fungal endophytes isolated from the bark of himalayan yew. **World Journal of Agricultural Sciences**. v. 2, n.4, p. 489-494, 2006.
- UECKER, F. A. A World list of Phomopsis names with notes on nomenclature, morphology and biology. **National Fungus Collection**, v. 13, 1988.
- VAN DER AA, H. A., M. E. Noordeloos, and J. de Gruy-ter. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. **Studies in Mycology**, v. 32, p. 3-19. 1990.
- VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**. v.3, p.232-238, 1998.
- WANG, F. W. et al. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. DOI 10.1007/s11274-006-9195-4. 2006.
- WANG, J. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 34, p. 51-57, 2002.
- WETTASINGHE, M; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **J Agric Food Chem**; v.47, n.5,p.1801-1812, 1999.
- WETZEL, H.C. I.I.I.; HULBERT, S.H.; TISSERAT, N.A. Molecular evidence for the presence of *Ophiosphaerella narmari* n. comb., a cause of spring dead spot of *Bermuda* grass, in North America. **Mycological Research**. v. 103, p.981–989, 1999.
- WHITE, J.F.;COLE,G. T. Endophyte-host associations in forege grasses: I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**. v.77,p.323-327, 1985.
- WHITE, T.J.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322. In INNIS, M. A.; GELFAND, M. D.;SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (eds), PCR Protocols: Guide to Methods and Applications. New York, Academica Press, 1990, 482p.
- WIYAKRUTTA, S. et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology &**

Biotechnology. v. 20, p. 265–272, 2004.

YANG, X. Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao.** v. 35, n.1, p. 79-81, 2004.

ZHANG, A. W.; RICCIONI, L.; PEDERSEN, W. L.; KOLLIPARA, K. P.; HARTMAN, G. L. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. **Phytopathology.** v. 88, p.1306 -1314, 1998.

ZHANG, Y.; JEEWON, R.; FOURNIER, J.; HYDE, K.D. Multi-gene phylogeny and morphotaxonomy of *Amniculicola lignicola*: a novel freshwater fungus from France and its relationships to the *Pleosporales*. **Mycological Research.** v. 112, p.1186–1194, 2008.

ANEXOS

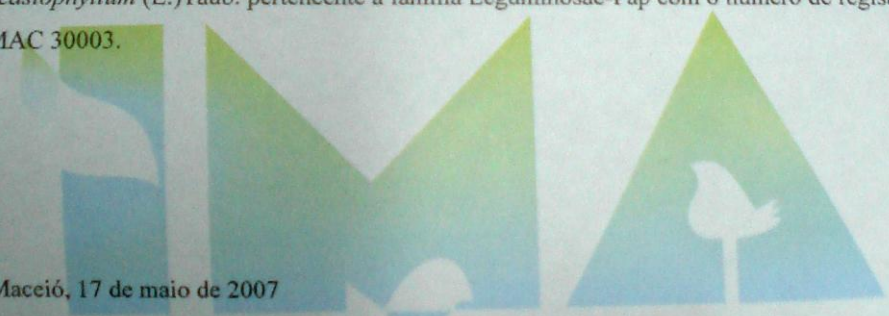
ANEXO A– Declaração de depósito das excidatas de *D. Ecastophyllum* no IMA.

ESTADO DE ALAGOAS
SECRETARIA COORDENADORA INFRA-ESTRUTURA E SERVIÇOS
SECRETARIA EXECUTIVA DE MEIO AMBIENTE RECURSOS HIDRICOS E NATURAIS
INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE - IMA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a planta enviada para identificação no herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente, pelo estudante Roberto Ramos Sobrinho do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, trata-se de: *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. pertencente a família Leguminosae-Pap com o número de registro MAC 30003.

Maceió, 17 de maio de 2007

The logo of the Instituto do Meio Ambiente (IMA) of Alagoas, featuring stylized green and blue shapes representing a landscape with a bird silhouette.
Maria Noemia Rodrigues
Maria Noemia Rodrigues
Pesquisadora do Herbário MAC

ANEXO B- Declaração de depósito das excidatas de *A. cochliocarpos* no IMA.



GOVERNO DO ESTADO DE ALAGOAS
SECRETARIA DE ESTADO DE PLANEJAMENTO
INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE - IMA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a planta enviada para identificação no herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, pela estudante Sandra Hiromi Kamei do curso de Ciências Biológicas – UFAL trata-se de: *Aburema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & J. W. Grimes pertencente a família Leguminosae-Mimosoideae com o número de registro MAC 34614.

Maceió, 02 de Dezembro 2008



Rosângela Pereira de Lyra Lemos
Curadora do herbário MAC

Rosângela P. de Lyra Lem.
Mat. 56329-1
CURADORA HERBÁRIO MAC - IMA

APÊNDICES

**APÊNDICE A– Análise estatísticas dos experimentos em que foram submetidos os
fungos endofíticos isolados**

ANALISE NUMERO 1

ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MEIO DE CULTURA E DA LUMINOSIDADE SOBRE O
CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ENDOFÍTICO ACF1.

FATOR A = MEIO DE CULTURA

FATOR B = LUMINOSIDADE

ANALISE DE UM EXPERIMENTO FATORIAL 6X2

TRAT.	NR	MEDIA D.PADRAO		OBSERVACOES ORIGINAIS									
11	10	4.9800	.8218	6.5000	6.2000	4.2000	4.2000	4.7000	4.2000	4.3000	4.3000	5.6000	5.6000
12	10	5.9500	.3961	6.0000	6.5000	6.3000	5.8000	5.0000	5.2000	5.6000	5.6000	7.0000	6.5000
21	10	6.8800	.0662	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	6.3000	6.5000	7.0000	7.0000
22	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
31	10	3.9000	.2378	4.3000	4.3000	4.3000	4.3000	3.5000	3.5000	3.2000	3.2000	4.1000	4.3000
32	10	4.8400	.4271	5.1000	5.2000	4.8000	4.1000	5.2000	5.1000	5.7000	5.4000	4.1000	3.7000
41	10	4.3600	.1116	4.1000	4.1000	4.2000	4.4000	4.3000	5.2000	4.6000	4.1000	4.3000	4.3000
42	10	5.5700	.2934	5.2000	5.3000	5.9000	5.7000	5.8000	5.6000	6.3000	6.3000	4.8000	4.8000
51	10	5.6700	.9823	6.9000	7.0000	4.8000	5.0000	6.3000	6.7000	4.6000	4.7000	4.8000	5.9000
52	10	6.8400	.0382	6.9000	7.0000	6.7000	6.7000	6.8000	6.9000	6.4000	7.0000	7.0000	7.0000
61	10	4.8700	.5201	4.8000	4.8000	5.6000	5.6000	3.4000	4.6000	5.5000	5.6000	4.4000	4.4000
62	10	6.1300	.2534	6.9000	6.5000	5.4000	5.6000	6.2000	5.9000	6.7000	6.5000	5.8000	5.8000

QUADRO A/B

(1)	1	2	3	4	5	6	
B 1	4.9800	6.8800	3.9000	4.3600	5.6700	4.8700	
B 2	5.9500	7.0000	4.8400	5.5700	6.8400	6.1300	
TOTAIS	10.9300	13.8800	8.7400	9.9300	12.5100	11.0000	66.9900

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	5	83.3428	16.6686	48.2202 **
FATOR B	1	26.7907	26.7907	77.5025 **
FATOR AXB	5	4.5068	.9014	2.6075 *
(TRATAMENTOS)	11	114.6403	10.4218	
RESIDUO	108	37.3330	.3457	

MEDIA GERAL DO ENSAIO 5.5825
 DESVIO PADRAO .5879
 COEFICIENTE DE VARIACAO 10.5319

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE A

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .5399
 TRAT. MEDIA

2	6.9400	A
5	6.2550	B
6	5.5000	C
1	5.4650	C
4	4.9650	C
3	4.3700	D

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE B

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .2128
 TRAT. MEDIA

2	6.0550	A
1	5.1100	B

DESDOBRAMENTO DE B D. A

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
B D. A(1)	1	4.7045	4.7045	13.6096 **
B D. A(2)	1	.0720	.0720	.2083 NS
B D. A(3)	1	4.4180	4.4180	12.7808 **
B D. A(4)	1	7.3205	7.3205	21.1773 **
B D. A(5)	1	6.8445	6.8445	19.8003 **
B D. A(6)	1	7.9380	7.9380	22.9637 **

(B D. A) (6) (31.2975)

DESDOBRAMENTO DE A D. B

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
A D. B(1)	5	55.4760	11.0952	32.0971 **
A D. B(2)	5	32.3735	6.4747	18.7305 **

(A D. B) (10) (87.8495)

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .5212
 TRAT. MEDIA

 2 5.9500 A
 1 4.9800 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 2

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .5212
 TRAT. MEDIA

 2 7.0000 A
 1 6.8800 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 3

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .5212
 TRAT. MEDIA

 2 4.8400 A
 1 3.9000 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 4

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .5212
 TRAT. MEDIA

 2 5.5700 A
 1 4.3600 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 5

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .5212
 TRAT. MEDIA

 2 6.8400 A
 1 5.6700 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 6

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .5212
 TRAT. MEDIA

 2 6.1300 A
 1 4.8700 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 1

TESTE DE TUKEY
DMS(TUKEY) = .7635
TRAT. MEDIA

2 6.8800 A
5 5.6700 B
1 4.9800 BC
6 4.8700 C
4 4.3600 CD
3 3.9000 D

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 2

TESTE DE TUKEY
DMS(TUKEY) = .7635
TRAT. MEDIA

2 7.0000 A
5 6.8400 AB
6 6.1300 BC
1 5.9500 C
4 5.5700 CD
3 4.8400 D

ANALISE NUMERO 2

ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MEIO DE CULTURA E DA LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ENDOFÍTICO ACF2.

FATOR A = MEIO DE CULTURA

FATOR B = LUMINOSIDADE

ANALISE DE UM EXPERIMENTO FATORIAL 6X2

TRAT. NR	MEDIA	D.PADRAO	OBSERVACOES ORIGINAIS											
11	10	6.8600	.0516	7.0000	6.8000	7.0000	7.0000	6.7000	7.0000	7.0000	7.0000	6.3000	6.8000	
12	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	
21	10	4.8300	5.8534	6.3000	6.6000	6.4000	5.0000	6.8000	6.7000	4.8000	4.7000	.5000	.5000	
22	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	
31	10	5.7000	.1867	5.0000	5.3000	5.4000	5.5000	6.3000	5.7000	6.1000	6.0000	6.2000	5.5000	
32	10	5.4600	.7449	5.8000	6.1000	4.0000	3.8000	6.0000	6.1000	6.0000	6.0000	5.4000	5.4000	
41	10	6.8300	.1957	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	5.6000	6.7000	
42	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	
51	10	2.8000	.6644	2.7000	1.9000	4.3000	3.3000	2.5000	2.0000	3.3000	1.8000	3.6000	2.6000	
52	10	5.2500	2.0339	6.5000	5.0000	3.3000	3.5000	5.8000	5.8000	7.0000	7.0000	5.1000	3.5000	
61	10	.9100	.1366	1.8000	.7000	.6000	.6000	1.0000	1.0000	1.0000	.6000	1.1000	.7000	
62	10	.8700	.1023	.8000	.7000	.8000	.8000	.8000	1.3000	1.5000	1.0000	.5000	.5000	

QUADRO A/B

(1)	1	2	3	4	5	6	
B 1	6.8600	4.8300	5.7000	6.8300	2.8000	.9100	
B 2	7.0000	7.0000	5.4600	7.0000	5.2500	.8700	
TOTAIS	13.8600	11.8300	11.1600	13.8300	8.0500	1.7800	60.5100

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	5	527.9528	105.5906	127.0970 **
FATOR B	1	18.0188	18.0188	21.6888 **
FATOR AXB	5	36.0767	7.2153	8.6850 **
(TRATAMENTOS)	11	582.0483	52.9135	
RESIDUO	108	89.7250	.8308	

MEDIA GERAL DO ENSAIO 5.0425
 DESVIO PADRAO .9115
 COEFICIENTE DE VARIACAO 18.0759

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE A

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8370
 TRAT. MEDIA

 1 6.9300 A
 4 6.9150 A
 2 5.9150 B
 3 5.5800 B
 5 4.0250 C
 6 .8900 D

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE B

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3299
 TRAT. MEDIA

 2 5.4300 A
 1 4.6550 B

DESDOBRAMENTO DE B D. A

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
B D. A(1)	1	.0980	.0980	.1180 NS
B D. A(2)	1	23.5445	23.5445	28.3400 **
B D. A(3)	1	.2880	.2880	.3467 NS
B D. A(4)	1	.1445	.1445	.1739 NS
B D. A(5)	1	30.0125	30.0125	36.1254 **
B D. A(6)	1	.0080	.0080	.0096 NS

 (B D. A) (6) (54.0955)

DESDOBRAMENTO DE A D. B

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
A D. B(1)	5	281.8135	56.3627	67.8425 **
A D. B(2)	5	282.2160	56.4432	67.9394 **

 (A D. B) (10) (564.0295)

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8080
 TRAT. MEDIA

 2 7.0000 A
 1 6.8600 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 2

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8080
 TRAT. MEDIA

 2 7.0000 A
 1 4.8300 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 3

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8080
 TRAT. MEDIA

 1 5.7000 A
 2 5.4600 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 4

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8080
 TRAT. MEDIA

 2 7.0000 A
 1 6.8300 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 5

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8080
 TRAT. MEDIA

 2 5.2500 A
 1 2.8000 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 6

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8080
 TRAT. MEDIA

 1 .9100 A
 2 .8700 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = 1.1837
 TRAT. MEDIA

 1 6.8600 A
 4 6.8300 A
 3 5.7000 AB
 2 4.8300 B
 5 2.8000 C
 6 .9100 D

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 2

TESTE DE TUKEY
DMS(TUKEY) = 1.1837
TRAT. MEDIA

1 7.0000 A
2 7.0000 A
4 7.0000 A
3 5.4600 B
5 5.2500 B
6 .8700 C

ANALISE NUMERO 3

ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MEIO DE CULTURA E DA LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ENDOFÍTICO ACF3.

FATOR A = MEIO DE CULTURA

FATOR B = LUMINOSIDADE

ANALISE DE UM EXPERIMENTO FATORIAL 6X2

TRAT. NR	MEDIA	D.PADRAO	OBSERVACOES ORIGINAIS											
			6.7000	6.3000	6.0000	6.0000	5.8000	5.8000	6.4000	6.2000	6.6000	6.0000		
11	10	6.1800	.0996	6.7000	6.3000	6.0000	6.0000	5.8000	5.8000	6.4000	6.2000	6.6000	6.0000	
12	10	6.4500	.0561	6.7000	7.0000	6.4000	6.3000	6.3000	6.2000	6.4000	6.5000	6.4000	6.3000	
21	10	6.3100	.0210	6.3000	6.4000	6.2000	6.2000	6.3000	6.2000	6.6000	6.1000	6.4000	6.4000	
22	10	6.9400	.0249	6.9000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	6.5000	7.0000	7.0000	7.0000	
31	10	6.0300	.0801	5.4000	5.9000	6.3000	6.3000	6.0000	6.0000	5.9000	6.4000	6.0000	6.1000	
32	10	6.9800	.0040	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	6.8000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	
41	10	6.4200	.1107	6.2000	6.8000	6.8000	6.8000	6.1000	5.8000	6.3000	6.4000	6.5000	6.5000	
42	10	6.5900	.0677	6.4000	6.4000	6.4000	6.4000	6.4000	6.4000	7.0000	7.0000	6.7000	6.8000	
51	10	5.5400	.4471	6.3000	6.9000	4.9000	5.2000	5.2000	5.2000	5.1000	4.9000	6.0000	5.7000	
52	10	5.5300	.2112	5.0000	5.0000	6.2000	6.0000	5.2000	5.2000	5.3000	5.5000	5.8000	6.1000	
61	10	3.1900	.0210	3.3000	3.3000	3.3000	3.3000	3.1000	3.3000	3.3000	3.0000	3.0000	3.0000	
62	10	3.9600	.6071	4.8000	4.8000	4.9000	4.9000	3.6000	3.6000	3.2000	3.2000	3.3000	3.3000	

QUADRO A/B

(1)	1	2	3	4	5	6	
B 1	6.1800	6.3100	6.0300	6.4200	5.5400	3.1900	
B 2	6.4500	6.9400	6.9800	6.5900	5.5300	3.9600	
TOTAIS	12.6300	13.2500	13.0100	13.0100	11.0700	7.1500	70.1200

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	5	138.9897	27.7979	190.5660 **
FATOR B	1	6.4403	6.4403	44.1511 **
FATOR AXB	5	3.5307	.7061	4.8408 **
(TRATAMENTOS)	11	148.9607	13.5419	
RESIDUO	108	15.7540	.1459	

MEDIA GERAL DO ENSAIO 5.8433
 DESVIO PADRAO .3819
 COEFICIENTE DE VARIACAO 6.5362

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE A

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3507
 TRAT. MEDIA

 2 6.6250 A
 3 6.5050 A
 4 6.5050 A
 1 6.3150 A
 5 5.5350 B
 6 3.5750 C

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE B

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .1382
 TRAT. MEDIA

 2 6.0750 A
 1 5.6117 B

DESDOBRAMENTO DE B D. A

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
B D. A(1)	1	.3645	.3645	2.4988 NS
B D. A(2)	1	1.9845	1.9845	13.6045 **
B D. A(3)	1	4.5125	4.5125	30.9350 **
B D. A(4)	1	.1445	.1445	.9906 NS
B D. A(5)	1	.0005	.0005	.0034 NS
B D. A(6)	1	2.9645	2.9645	20.3228 **

 (B D. A) (6) (9.9710)

DESDOBRAMENTO DE A D. B

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
A D. B(1)	5	75.0868	15.0174	102.9501 **
A D. B(2)	5	67.4335	13.4867	92.4567 **

 (A D. B) (10) (142.5203)

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3386
 TRAT. MEDIA

 2 6.4500 A
 1 6.1800 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 2

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3386

TRAT. MEDIA

 2 6.9400 A
 1 6.3100 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 3

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3386
 TRAT. MEDIA

 2 6.9800 A
 1 6.0300 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 4

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3386
 TRAT. MEDIA

 2 6.5900 A
 1 6.4200 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 5

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3386
 TRAT. MEDIA

 1 5.5400 A
 2 5.5300 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 6

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3386
 TRAT. MEDIA

 2 3.9600 A
 1 3.1900 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .4960
 TRAT. MEDIA

 4 6.4200 A
 2 6.3100 A
 1 6.1800 A
 3 6.0300 AB
 5 5.5400 B
 6 3.1900 C

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 2

TESTE DE TUKEY
DMS(TUKEY) = .4960
TRAT. MEDIA

3 6.9800 A
2 6.9400 AB
4 6.5900 AB
1 6.4500 B
5 5.5300 C
6 3.9600 D

ANALISE NUMERO 4

ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MEIO DE CULTURA E DA LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ENDOFÍTICO DEF1.

FATOR A = MEIO DE CULTURA

FATOR B = LUMINOSIDADE

ANALISE DE UM EXPERIMENTO FATORIAL 6X2

TRAT. NR	MEDIA	D.PADRAO	OBSERVACOES ORIGINAIS										

11	10	6.3400	.0138	6.2000	6.2000	6.2000	6.5000	6.4000	6.3000	6.4000	6.5000	6.3000	6.4000
12	10	6.7400	.1116	7.0000	7.0000	6.6000	6.8000	6.9000	7.0000	6.9000	6.9000	6.2000	6.1000
21	10	6.3300	.1690	7.0000	7.0000	5.8000	6.2000	6.2000	6.2000	6.6000	6.3000	6.0000	6.0000
22	10	6.8000	.0711	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	6.6000	6.6000	6.4000	6.4000
31	10	3.1400	1.9560	3.8000	3.8000	3.5000	3.7000	4.0000	4.0000	3.8000	3.8000	.5000	.5000
32	10	3.1200	1.9418	3.5000	3.5000	3.7000	3.8000	4.0000	4.0000	4.0000	3.7000	.5000	.5000
41	10	4.6300	.0757	4.5000	4.9000	4.7000	4.7000	4.0000	4.5000	4.5000	4.7000	4.9000	4.9000
42	10	4.8400	.0293	4.8000	4.8000	4.8000	4.9000	4.5000	4.7000	5.0000	5.0000	4.8000	5.1000
51	10	4.8700	.0934	5.2000	5.1000	4.5000	4.5000	5.2000	5.2000	4.7000	5.0000	4.8000	4.5000
52	10	5.5100	.0810	5.6000	5.5000	5.2000	5.4000	5.0000	5.4000	5.6000	5.6000	6.0000	5.8000
61	10	3.1000	.0644	3.2000	3.2000	3.2000	3.4000	3.3000	3.2000	3.1000	3.1000	2.7000	2.6000
62	10	3.7600	.6360	3.1000	3.1000	3.4000	3.4000	3.4000	4.0000	5.2000	5.2000	3.4000	3.4000

QUADRO A/B

(1)	1	2	3	4	5	6	
B 1	6.3400	6.3300	3.1400	4.6300	4.8700	3.1000	
B 2	6.7400	6.8000	3.1200	4.8400	5.5100	3.7600	
TOTAIS	13.0800	13.1300	6.2600	9.4700	10.3800	6.8600	59.1800

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	5	217.2187	43.4437	99.4304 **
FATOR B	1	4.6413	4.6413	10.6227 **
FATOR AXB	5	1.7117	.3423	.7835 NS
(TRATAMENTOS)	11	223.5717	20.3247	
RESIDUO	108	47.1880	.4369	

MEDIA GERAL DO ENSAIO 4.9317
DESVIO PADRAO .6610
COEFICIENTE DE VARIACAO 13.4033

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE A

TESTE DE TUKEY
DMS(TUKEY) = .6070
TRAT. MEDIA

2 6.5650 A
1 6.5400 A
5 5.1900 B
4 4.7350 B
6 3.4300 C
3 3.1300 C

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE B

TESTE DE TUKEY
DMS(TUKEY) = .2392
TRAT. MEDIA

2 5.1283 A
1 4.7350 B

ANALISE NUMERO 5

ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MEIO DE CULTURA E DA LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ENDOFÍTICO DEF2.

FATOR A = MEIO DE CULTURA

FATOR B = LUMINOSIDADE

ANALISE DE UM EXPERIMENTO FATORIAL 6X2

TRAT.	NR	MEDIA D.PADRAO		OBSERVACOES ORIGINAIS									
11	10	6.8000	.1000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	6.4000	6.1000	6.7000	6.8000	7.0000	7.0000
12	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
21	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
22	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
31	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
32	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
41	10	4.9000	.1133	4.7000	5.3000	4.6000	4.6000	4.8000	4.8000	5.3000	5.5000	4.8000	4.6000
42	10	5.9300	.8179	6.3000	6.0000	6.6000	6.6000	7.0000	7.0000	4.9000	4.9000	4.7000	5.3000
51	10	7.0000	.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
52	10	6.9500	.0117	7.0000	7.0000	6.7000	6.8000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
61	10	5.6500	.4694	6.0000	5.2000	6.2000	6.3000	5.7000	6.0000	4.3000	4.7000	6.1000	6.0000
62	10	6.4600	.0893	5.9000	6.3000	6.1000	6.6000	6.6000	6.6000	6.8000	6.6000	6.8000	6.3000

QUADRO A/B

(1)	1	2	3	4	5	6	
B 1	6.8000	7.0000	7.0000	4.9000	7.0000	5.6500	
B 2	7.0000	7.0000	7.0000	5.9300	6.9500	6.4600	
TOTAIS	13.8000	14.0000	14.0000	10.8300	13.9500	12.1100	78.6900

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	5	44.8208	8.9642	67.1612 **
FATOR B	1	3.3001	3.3001	24.7249 **
FATOR AXB	5	5.4974	1.0995	8.2375 **
(TRATAMENTOS)	11	53.6182	4.8744	
RESIDUO	108	14.4150	.1335	

MEDIA GERAL DO ENSAIO 6.5575
 DESVIO PADRAO .3653
 COEFICIENTE DE VARIACAO 5.5713

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE A

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3355
 TRAT. MEDIA

 2 7.0000 A
 3 7.0000 A
 5 6.9750 A
 1 6.9000 A
 6 6.0550 B
 4 5.4150 C

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE B

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .1322
 TRAT. MEDIA

 2 6.7233 A
 1 6.3917 B

DESDOBRAMENTO DE B D. A

CAUSAS DE VARIACAO GL. S.Q. Q.M. F

 B D. A(1) 1 .2000 .2000 1.4984 NS
 B D. A(2) 1 .0000 .0000 .0000 NS
 B D. A(3) 1 .0000 .0000 .0000 NS
 B D. A(4) 1 5.3045 5.3045 39.7424 **
 B D. A(5) 1 .0125 .0125 .0937 NS
 B D. A(6) 1 3.2805 3.2805 24.5781 **

(B D. A) (6) (8.7975)

DESDOBRAMENTO DE A D. B

CAUSAS DE VARIACAO GL. S.Q. Q.M. F

 A D. B(1) 5 40.5208 8.1042 60.7180 **
 A D. B(2) 5 9.7973 1.9595 14.6807 **

(A D. B) (10) (50.3182)

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3239
 TRAT. MEDIA

 2 7.0000 A
 1 6.8000 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 2

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3239
 TRAT. MEDIA

 1 7.0000 A
 2 7.0000 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 3

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3239
 TRAT. MEDIA

 1 7.0000 A
 2 7.0000 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 4

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3239
 TRAT. MEDIA

 2 5.9300 A
 1 4.9000 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 5

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3239
 TRAT. MEDIA

 1 7.0000 A
 2 6.9500 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 6

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3239
 TRAT. MEDIA

 2 6.4600 A
 1 5.6500 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .4744
 TRAT. MEDIA

 2 7.0000 A
 3 7.0000 A
 5 7.0000 A
 1 6.8000 A
 6 5.6500 B
 4 4.9000 C

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 2

TESTE DE TUKEY
DMS(TUKEY) = .4744
TRAT. MEDIA

1 7.0000 A
2 7.0000 A
3 7.0000 A
5 6.9500 A
6 6.4600 B
4 5.9300 C

ANALISE NUMERO 6

ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MEIO DE CULTURA E DA LUMINOSIDADE SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ENDOFÍTICO DENS.

FATOR A = MEIO DE CULTURA

FATOR B = LUMINOSIDADE

ANALISE DE UM EXPERIMENTO FATORIAL 6X2

TRAT.	NR	MEDIA	D.PADRAO	OBSERVACOES ORIGINAIS									
11	10	6.6200	.4329	6.8000	7.0000	7.0000	7.0000	6.6000	7.0000	7.0000	7.0000	5.3000	5.5000
12	10	6.4800	1.2040	7.0000	7.0000	4.5000	4.3000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
21	10	6.7100	.2099	7.0000	7.0000	5.8000	6.0000	6.8000	6.5000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
22	10	6.4200	.7062	4.7000	5.5000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	5.7000	6.3000	7.0000	7.0000
31	10	5.0700	1.2423	4.5000	4.5000	3.5000	3.7000	6.5000	6.4000	6.5000	5.5000	4.8000	4.8000
32	10	6.5400	.1627	6.7000	6.7000	7.0000	7.0000	7.0000	6.3000	5.9000	6.5000	6.1000	6.2000
41	10	6.1400	.4204	6.1000	6.5000	6.4000	6.5000	5.7000	5.7000	5.2000	5.3000	7.0000	7.0000
42	10	6.4100	.0299	6.4000	6.4000	6.2000	6.2000	6.3000	6.5000	6.4000	6.5000	6.4000	6.8000
51	10	3.2300	2.2112	3.3000	3.3000	3.9000	3.9000	4.5000	4.0000	4.2000	4.2000	.5000	.5000
52	10	4.8400	1.3960	4.0000	4.6000	7.0000	7.0000	4.0000	4.0000	4.1000	4.4000	4.3000	5.0000
61	10	5.7000	.5733	5.8000	5.8000	6.8000	6.8000	4.7000	4.5000	5.9000	5.9000	5.3000	5.5000
62	10	6.0200	1.5618	6.8000	6.8000	4.2000	3.9000	7.0000	7.0000	5.2000	5.3000	7.0000	7.0000

QUADRO A/B

(1)	1	2	3	4	5	6	
B 1	6.6200	6.7100	5.0700	6.1400	3.2300	5.7000	
B 2	6.4800	6.4200	6.5400	6.4100	4.8400	6.0200	
TOTAIS	13.1000	13.1300	11.6100	12.5500	8.0700	11.7200	70.1800

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
FATOR A	5	89.5637	17.9127	21.1762 **
FATOR B	1	8.7480	8.7480	10.3418 **
FATOR AXB	5	16.4120	3.2824	3.8804 **
(TRATAMENTOS)	11	114.7237	10.4294	
RESIDUO	108	91.3560	.8459	

MEDIA GERAL DO ENSAIO 5.8483
 DESVIO PADRAO .9197
 COEFICIENTE DE VARIACAO 15.7262

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE A

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8446
 TRAT. MEDIA

 2 6.5650 A
 1 6.5500 A
 4 6.2750 A
 6 5.8600 A
 3 5.8050 A
 5 4.0350 B

TESTE DE TUKEY PARA AS MEDIAS DE B

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .3329
 TRAT. MEDIA

 2 6.1183 A
 1 5.5783 B

DESDOBRAMENTO DE B D. A

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
B D. A(1)	1	.0980	.0980	.1159 NS
B D. A(2)	1	.4205	.4205	.4971 NS
B D. A(3)	1	10.8045	10.8045	12.7730 **
B D. A(4)	1	.3645	.3645	.4309 NS
B D. A(5)	1	12.9605	12.9605	15.3218 **
B D. A(6)	1	.5120	.5120	.6053 NS

 (B D. A) (6) (25.1600)

DESDOBRAMENTO DE A D. B

CAUSAS DE VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
A D. B(1)	5	84.6908	16.9382	20.0241 **
A D. B(2)	5	21.2848	4.2570	5.0325 **

 (A D. B) (10) (105.9757)

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8153
 TRAT. MEDIA

 1 6.6200 A
 2 6.4800 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 2

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8153
 TRAT. MEDIA

 1 6.7100 A
 2 6.4200 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 3

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8153
 TRAT. MEDIA

 2 6.5400 A
 1 5.0700 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 4

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8153
 TRAT. MEDIA

 2 6.4100 A
 1 6.1400 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 5

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8153
 TRAT. MEDIA

 2 4.8400 A
 1 3.2300 B

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE B DENTRO DE A 6

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = .8153
 TRAT. MEDIA

 2 6.0200 A
 1 5.7000 A

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 1

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = 1.1944
 TRAT. MEDIA

 2 6.7100 A
 1 6.6200 A
 4 6.1400 AB
 6 5.7000 AB
 3 5.0700 B
 5 3.2300 C

TESTE DE TUKEY PARA MEDIAS DE A DENTRO DE B 2

TESTE DE TUKEY
DMS(TUKEY) = 1.1944
TRAT. MEDIA

3 6.5400 A
1 6.4800 A
2 6.4200 A
4 6.4100 A
6 6.0200 AB
5 4.8400 B

ANALISE NUMERO 1

ANTAGONISMO ACF1

REPETICOES					
TRATAMENTOS	1	2	3	4	
1	6.6700	12.1200	27.0300	20.0000	65.8200
2	16.6700	9.0900	18.9200	25.7100	70.3900
3	10.0000	-15.1500	16.2200	8.5700	19.6400
4	33.3300	24.2400	54.0500	51.4300	163.0500
5	33.3300	39.3900	54.0500	45.7100	172.4800
6	53.3300	39.3900	59.4600	57.1400	209.3200

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5.	6998.0469	1399.6094	12.31 **
RESIDUO	18.	2046.2939	113.6830	
TOTAL	23.	9044.3408		

DESVIO PADRAO = 10.6622

ERRO PADRAO DA MEDIA = 5.3311

MEDIA GERAL = 29.1958

COEFICIENTE DE VARIACAO = 36.52

TESTE DE TUKEY

DMS(TUKEY) = 23.9900

TRAT. MEDIA

6	52.3300	A
5	43.1200	A
4	40.7625	AB
2	17.5975	BC
1	16.4550	C
3	4.9100	C

ANALISE NUMERO 2

ANTAGONISMO ACF2

TRATAMENTOS	REPETICOES				
	1	2	3	4	
1	31.9100	33.3300	38.7800	38.3000	142.3200
2	42.5500	42.2200	42.8600	40.4300	168.0600
3	25.5300	33.3300	28.5700	38.3000	125.7300
4	48.9400	53.3300	53.0600	46.8100	202.1400
5	53.1900	46.6700	53.0600	57.4500	210.3700
6	53.1900	55.5600	59.1800	59.5700	227.5000

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5.	2043.4591	408.6918	29.28 **
RESIDUO	18.	251.2594	13.9589	
TOTAL	23.	2294.7185		

DESVIO PADRAO = 3.7362
 MEDIA GERAL = 44.8383

ERRO PADRAO DA MEDIA = 1.8681
 COEFICIENTE DE VARIACAO = 8.33

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = 8.4063
 TRAT. MEDIA

6	56.8750 A
5	52.5925 A
4	50.5350 A
2	42.0150 B
1	35.5800 BC
3	31.4325 C

ANALISE NUMERO 3

ANTAGONISMO ACF3

TRATAMENTOS	REPETICOES				
	1	2	3	4	
1	-35.7100	6.6700	.0000	20.0000	-9.0400
2	-7.1400	.0000	14.2900	.0000	7.1500
3	-7.1400	6.6700	.0000	.0000	-.4700
4	28.5700	40.0000	42.8600	40.0000	151.4300
5	50.0000	40.0000	35.7100	33.3300	159.0400
6	35.7100	53.3300	28.5700	33.3300	150.9400

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5.	9004.8912	1800.9782	12.14 **
RESIDUO	18.	2670.9107	148.3839	
TOTAL	23.	11675.8019		

DESVIO PADRAO = 12.1813 ERRO PADRAO DA MEDIA = 6.0906
 MEDIA GERAL = 19.1271 COEFICIENTE DE VARIACAO = 63.69

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = 27.4079
 TRAT. MEDIA

5	39.7600 A
4	37.8575 A
6	37.7350 A
2	1.7875 B
3	-.1175 B
1	-2.2600 B

ANALISE NUMERO 4

ANTAGONISMO DEF1

	REPETICOES				
TRATAMENTOS	1	2	3	4	
1	40.0000	43.0800	37.5000	37.5000	158.0800
2	38.4600	44.6200	39.0600	37.5000	159.6400
3	24.6200	23.0800	20.3100	23.4400	91.4500
4	53.8500	53.8500	53.1300	53.1300	213.9600
5	53.8500	63.0800	54.6900	53.1300	224.7500
6	61.5400	60.0000	57.8100	60.9400	240.2900

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5.	3878.9305	775.7861	103.46 **
RESIDUO	18.	134.9768	7.4987	
TOTAL	23.	4013.9073		

DESVIO PADRAO = 2.7384

ERRO PADRAO DA MEDIA = 1.3692

MEDIA GERAL = 45.3404

COEFICIENTE DE VARIACAO = 6.04

TESTE DE TUKEY

DMS(TUKEY) = 6.1613

TRAT. MEDIA

6	60.0725	A
5	56.1875	AB
4	53.4900	B
2	39.9100	C
1	39.5200	C
3	22.8625	D

ANALISE NUMERO 5

ANTAGONISMO DEF2

TRATAMENTOS	REPETICOES				
	1	2	3	4	
1	38.4600	38.1000	43.0800	39.0600	158.7000
2	43.0800	44.4400	40.0000	34.3800	161.9000
3	23.0800	20.6300	23.0800	20.3100	87.1000
4	53.8500	44.4400	50.7700	50.0000	199.0600
5	53.8500	52.3800	53.8500	53.1300	213.2100
6	66.1500	65.0800	69.2300	60.9400	261.4000

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5.	4375.8862	875.1772	95.20 **
RESIDUO	18.	165.4781	9.1932	
TOTAL	23.	4541.3643		

DESVIO PADRAO = 3.0320
 MEDIA GERAL = 45.0571

ERRO PADRAO DA MEDIA = 1.5160
 COEFICIENTE DE VARIACAO = 6.73

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = 6.8221
 TRAT. MEDIA

6	65.3500	A
5	53.3025	B
4	49.7650	B
2	40.4750	C
1	39.6750	C
3	21.7750	D

ANALISE NUMERO 6

ANTAGONISMO DENS

TRATAMENTOS	REPETICOES				
	1	2	3	4	
1	30.7700	41.5400	35.3800	35.3800	143.0700
2	44.6200	35.3800	38.4600	38.4600	156.9200
3	20.0000	23.0800	23.0800	23.0800	89.2400
4	50.7700	47.6900	47.6900	44.6200	190.7700
5	43.0800	43.0800	44.6200	47.6900	178.4700
6	55.3800	53.8500	47.6900	50.7700	207.6900

QUADRO DE ANALISE DE VARIANCIA DO EXPERIMENTO

C. VARIACAO	GL.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5.	2214.7586	442.9517	44.60 **
RESIDUO	18.	178.7635	9.9313	
TOTAL	23.	2393.5221		

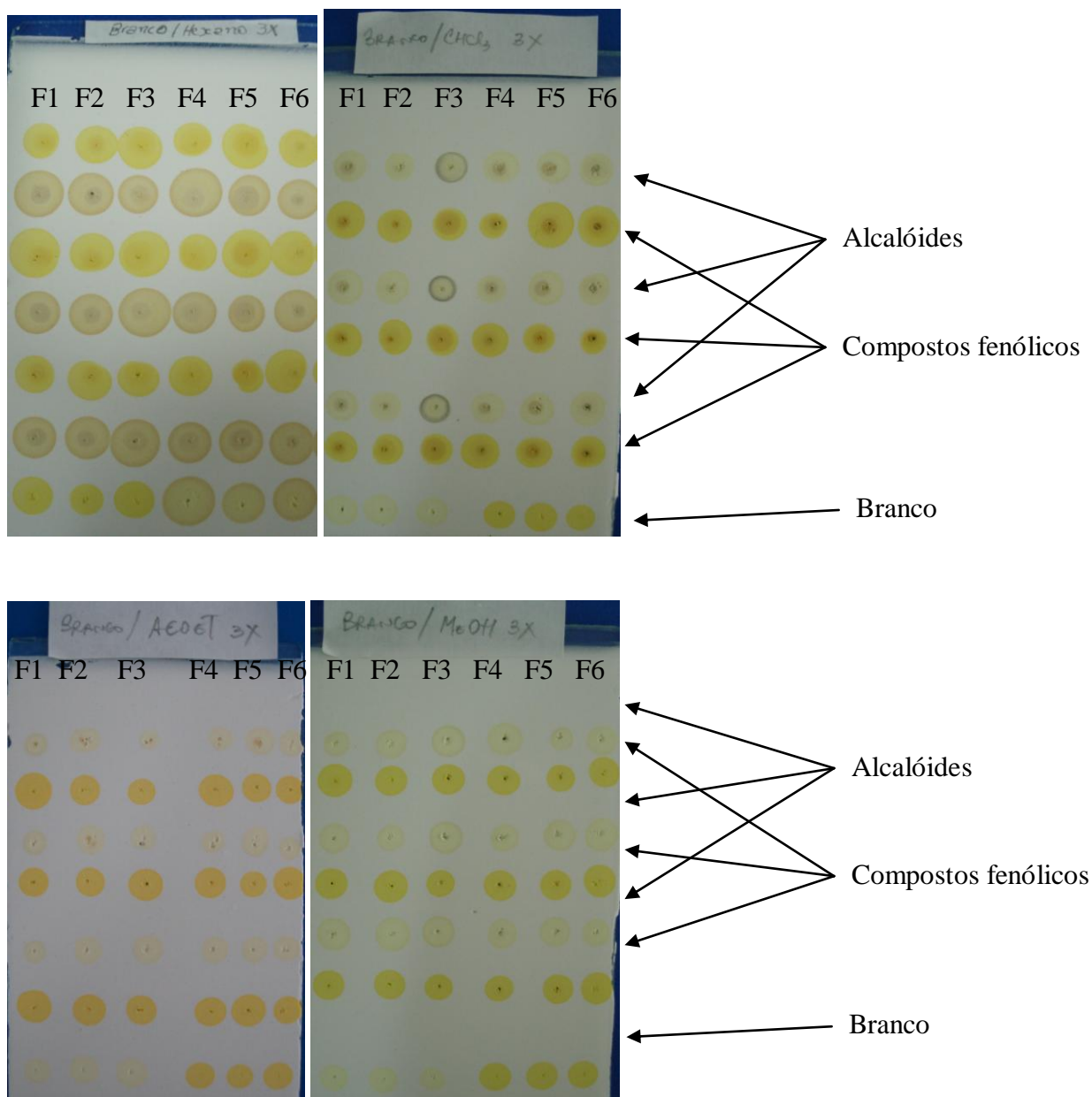
DESVIO PADRAO = 3.1514
 MEDIA GERAL = 40.2567

ERRO PADRAO DA MEDIA = 1.5757
 COEFICIENTE DE VARIACAO = 7.83

TESTE DE TUKEY
 DMS(TUKEY) = 7.0906
 TRAT. MEDIA

6	51.9225	A
4	47.6925	AB
5	44.6175	BC
2	39.2300	CD
1	35.7675	D
3	22.3100	E

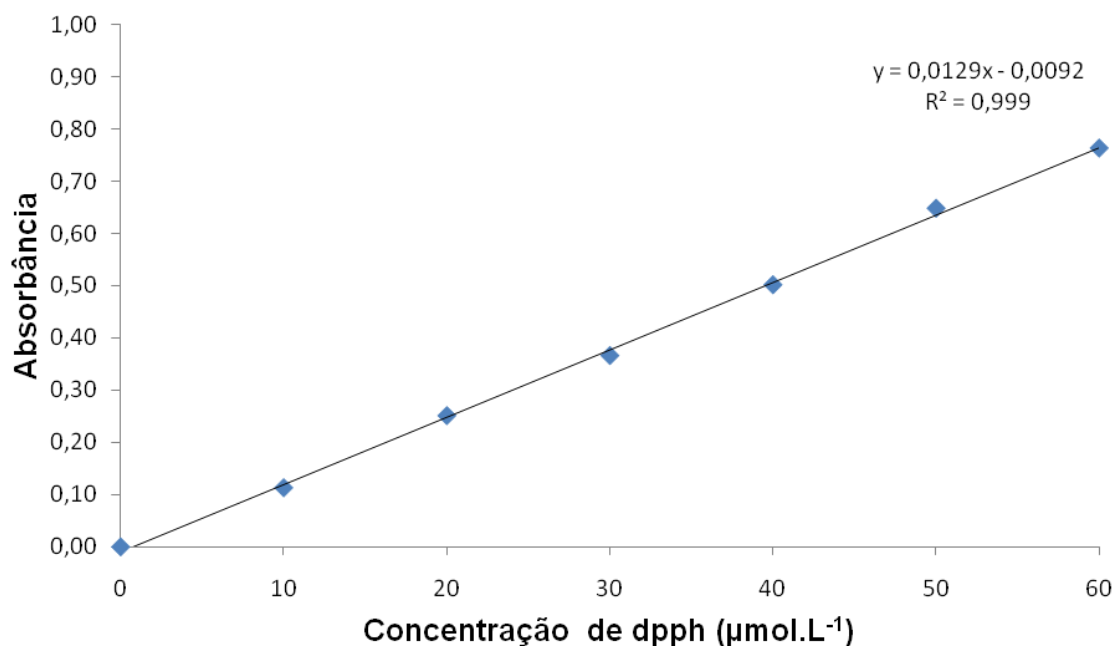
APÊNDICE B- Cromatoplasacas para identificação de alcalóides e compostos fenólicos com extratos dos fungos endofíticos.



F1: AcF1
 F2: AcF2
 F3: AcF3
 F4: DeF1
 F5: DeF2
 F6: DeNs

APÊNDICE D– Curvas de calibração utilizadas nos experimentos de atividade antioxidante dos extratos dos fungos endofíticos isolados.

Curva de calibração dos extratos que utilizaram hexano e clorofórmio como solventes.



Fonte: (Autor, 2011)

Curva de calibração dos extratos que utilizaram acetato de etila e metanol como solvente.

