



UFAL

Universidade Federal de Alagoas

Instituto de Química e Biotecnologia

**Programa de Pós-Graduação em Química e
Biotecnologia**

PPGQB



IQB

Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae).

Maria Aliete Bezerra Lima Machado

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 Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano (IQB/UFAL)

Maceió - Alagoas
Dezembro de 2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

M311i Machado, Maria Aliete Bezerra Lima.
Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae) / Maria Aliete Bezerra Lima Machado, 2009.
xv, 126 f. : il. grafs. e tabs.

Orientador: Luiz Carlos Caetano.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia, 2009.

Bibliografia: f. 96-114.
Anexos: f. 115-126

1. Microbiologia. 2. *Caesalpinia echinata*. 3. Pau-brasil. 4. Fungos endofíticos. 5. Fungos fitopatogênicos. I. Título.

CDU: 582.738



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 **Maria Aliete Bezerra Lima Machado** intitulada: **"Isolamento, Caracterização e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Fungos Endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae)"**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 18 de dezembro de 2009, às 9h na sala de aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.º Dr.º Luiz Carlos Caetano
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

Prof.ª Dr.ª Ana Maria Guerrero López
IQB/UFAL

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

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

Prof.ª Dr.ª Maria Cristina Caño de Andrade
PPGQB/IQB/UFAL

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi fácil, mas teria sido muito mais difícil se eu não tivesse a ajuda de pessoas que de forma direta ou indireta me ajudaram a conquistar essa vitória. Se momentaneamente a memória tiver falhado e ter esquecido de alguém, perdoem-me e tenham certeza que lhes sou grata, mesmo sem seu nome estar aqui. Sendo assim, agradeço:

A Deus, sobretudo;

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano, por ter me orientado e me ajudado a vencer as dificuldades no decorrer do curso;

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realizar este trabalho;

À CAPES, pela bolsa de pesquisa fornecida nos dois primeiros anos do doutorado;

À Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro Lopez que foi uma espécie de “madrinha” que me levou a fazer este doutorado, e também pelos ensinamentos em uma das disciplinas do curso;

À Profa. Dra. Simoni Margareti Plentz Meneghetti e à Profa. Dra. Margarida Maria dos Santos Humberto, por toda ajuda na minha preparação para o processo de seleção;

Aos meus professores do curso: Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart, Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento, Profa. Dra. Lúcia Maria Conserva;

Ao Prof. Dr. Zenaldo Porfírio da Silva pelo valioso auxílio, pela disponibilidade do laboratório e de todos os materiais necessários para os testes de atividade antimicrobiana;

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva e toda a sua equipe do Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL, em especial a aluna Sandra Hiromi Kamei, pela identificação molecular dos fungos endofíticos;

À Profa. Dra. Carmem Lúcia de Paiva e Silva Zanta, pelo empenho na disponibilização de uma bolsa de doutorado, quando foi Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia;

Ao Prof. Dr. Edson de Souza Bento pela amizade e apoio;

À amiga Sandra Quintela pela ótima convivência, pelas valiosas sugestões e ajuda no laboratório;

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas e Microrganismos Endofíticos: Vladimilza, Demetrius, Roberto, Gian Brito, Érica Dutra, José Roberto, Elida, Júlio César, Wirla, Thaís, Rosângela, Adriana, Crisólogo, Lisiane, Dayse, pela agradável convivência e ajuda;

Aos estagiários Adso, Diogo, Ceiça, Luiz e Nayara, por toda a ajuda;

Ao colega Ricardo Manoel, pela excelente interação e cooperação no trabalho diário dentro do laboratório, e pela amizade;

Aos colegas de Pós-graduação, Sandovânio, Alan, Antônio, João, Aislane, Natalino, Rousseau, Gilvan, Eid, Lisete, Gerson, pelos momentos difíceis, de muito estudo e dedicação, durante a obtenção dos créditos;

À Profa. Dra. Eliane Holanda Cavalcante, Coordenadora do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca, por toda a compreensão e ajuste de horários para facilitar a conciliação da minha docência com a minha discência;

A meus pais, por terem feito sacrifícios para me dar uma educação de qualidade e pelo amor incondicional;

A minhas avós, Aliete (*in memorian*) e Francisca exemplos de mulheres fortes e batalhadoras;

A minhas tias, tios, primos, primas, sobrinhos e sobrinhas por todo amor e carinho;

Ao amigo Luiz Carlos Ramos Ferreira, por estar sempre pronto a me ajudar, disponibilizando diversos materiais;

Às minhas amigas Ana Teresa, Flávia Moura e Rosângela Lyra por todos os incentivos;

E a todos os amigos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Dedico este trabalho a Erikson Machado de Melo, meu esposo, que se dedicou totalmente à minha tese. Abriu mão de seus sonhos em prol dos meus. Pelo amor, companherismo, compreensão, apoio, por me dar suporte nas horas mais difíceis, por me ouvir e ter muita paciência, por toda minha ausência.

Ofereço à Mata Atlântica

Que este trabalho seja mais um subsídio para que a conservem por infinitas gerações.

Sua beleza encanta, e nas águas cristalinas de suas nascentes, reflete-se o verde de suas folhas, contrastantes com as cores de suas flores. As amarelas do pau-brasil destacam-se tanto pela cor quanto pelo seu cheiro. O canto de suas aves a torna mais deslumbrante. Se todos a conhecessem um pouco como a conheço, saberiam dar-lhe o seu verdadeiro valor.

CURRICULUM VITAE

MARIA ALIETE BEZERRA LIMA MACHADO, filha de Oderman Bezerra Lemos e Zildete de Lima Alves Bezerra, nasceu em Itapetinga, no Estado da Bahia, no dia 11 de fevereiro de 1970.

Diplomou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Sergipe, em março de 1995.

Em setembro de 1997 foi contratada para exercer o cargo de Bióloga, na Coordenação do Meio Ambiente, na Prefeitura Municipal de Marechal Deodoro, no Estado de Alagoas. Em janeiro de 2000 foi aprovada em primeiro lugar no concurso público, dessa mesma prefeitura, para exercer o cargo de Bióloga, na Secretaria Municipal de Meio Ambiente.

Em março de 2000, ingressou no Curso de Mestrado em Agronomia “Produção Vegetal”, na linha de pesquisa da Silvicultura, no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas.

Em maio de 2001 foi aprovada no concurso público, da Secretaria Estadual de Educação, do Estado de Alagoas, para exercer o cargo de Professora de Biologia.

Em janeiro de 2003 defendeu a dissertação de Mestrado em Agronomia, tendo a mesma sido aprovada.

Em agosto de 2004, ingressou no Curso de Doutorado em Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas.

Em agosto de 2006, após ter sido aprovada em concurso público, tomou posse como Professora Assistente, do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Alagoas-Campus Arapiraca.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
3.1. Botânica e considerações sobre <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.....	4
3.2. Microrganismos endofíticos.....	8
3.2.1. Considerações gerais.....	8
3.2.2. Microrganismos endofíticos e plantas medicinais.....	11
3.2.3. Endofíticos produtores de substâncias antimicrobianas.....	16
3.2.4. Antagonismo entre microrganismos.....	23
4. CAPÍTULO I: Isolamento e caracterização morfológica e molecular de fungos endofíticos de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.....	29
4.1. Introdução.....	29
4.2. Material e Métodos.....	30
4.2.1. Material vegetal.....	30
4.2.2. Meios de cultura.....	30
4.2.2.1. Ágar-Água.....	30
4.2.2.2. Batata, Dextrose e Ágar.....	30
4.2.2.3. Meio Cenoura Ágar.....	31
4.2.2.4. Meio YPD.....	31
4.2.3. Procedimento de isolamento e identificação.....	32
4.2.3.1. Isolamento dos microrganismos endofíticos.....	32
4.2.3.2. Identificação dos microrganismos endofíticos.....	32

4.2.3.3. Identificação dos endofíticos através de técnicas moleculares.....	33
4.2.3.3.1. Extração de DNA.....	33
4.2.3.3.2. Amplificação do rDNA.....	34
4.2.3.3.3. Purificação dos produtos da PCR.....	36
4.2.3.3.4. Reação para seqüenciamento.....	36
4.2.3.3.5. Purificação dos produtos da reação de seqüenciamento.....	37
4.2.3.3.6. Seqüenciamento e análise dos dados.....	37
4.3. Resultados e discussão.....	38
4.3.1. Isolamento de fungos endofíticos de pau-brasil.....	38
4.3.2. Caracterização morfológica e molecular de fungos endofíticos de pau-brasil.....	41
4.4. Conclusões.....	46
5. CAPÍTULO II: Antagonismo entre os fungos endofíticos de <i>Caesalpinia echinata</i> e fitopatógenos.....	47
5.1. Introdução.....	47
5.2. Material e métodos.....	49
5.2.1. Obtenção dos fungos endofíticos e dos fitopatógenos.....	50
5.2.2. Meios de cultura.....	51
5.2.2.1. Batata, Dextrose e Ágar (BDA).....	51
5.2.2.2. Meio Cenoura (CA).....	52
5.2.2.3. Batata, Cenoura e Ágar (BCA).....	52
5.2.3. Atividade antifúngica em meio sólido.....	52
5.2.4. Análise estatística.....	54
5.3. Resultados e discussão.....	54
5.4. Conclusões.....	75
6. CAPÍTULO III: Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos de <i>Caesalpinia echinata</i>	77
6.1. Introdução.....	77
6.2. Material e Métodos.....	78
6.2.1. Obtenção dos fungos endofíticos.....	78
6.2.2. Meios de cultura utilizados.....	79
6.2.2.1. Meio Batata Dextrose (BD).....	79
6.2.2.2. Meio Batata Cenoura (BC).....	79
6.2.2.3. Caldo de Batata-Doce (CBD).....	79
6.2.2.4. Caldo de Cenoura (CC).....	80

6.2.2.5. Batata-Sacarose (BS).....	80
6.2.2.6. Meio Ágar Mueller-Hinton (MHA).....	80
6.2.3. Fermentação líquida dos extratos brutos dos fungos.....	81
6.2.4. Preparação dos extratos produzidos pelos fungos endofíticos.....	81
6.2.5. Atividade antimicrobiana em meio sólido.....	82
6.3. Resultados e discussão.....	83
6.4. Conclusões.....	95
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
9. ANEXOS.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore da espécie <i>Caesalpinia echinata</i> (A), detalhe do fruto (B) e da flor (C).....	4
Figura 2. Fórmula estrutural da brasileína (1) e da brasilina (2), compostos oriundos de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (Oliveira et al., 2002).....	5
Figura 3. Fórmulas estruturais dos constituintes voláteis das folhas e flores de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (Rezende et al., 2004).....	7
Figura 4. Modelo do cluster gênico que codifica para RNA ribossômico (Kamei, 2008).....	34
Figura 5. Folhas de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. em meio ágar-água (A) e formação de colônias de endofíticos ao redor delas (B), surgindo após 19 dias de incubação.....	38
Figura 6. Aspecto geral das colônias isolados de <i>C. echinata</i> , de árvores da mata, C.e.A6.F4.c.r. (A e B), C.e.A6.F4.c.b. (C e D), C.e.A7.F3.c. (E e F) e C.e.A9.f. (G e H), (verso das culturas estão acima e reverso das mesmas estão abaixo), após 15 dias de crescimento em meio BDA a 28°C.	39
Figura 7. Aspecto geral das colônias isolados de <i>C. echinata</i> , de árvores da UFAL, C.e.AU2.F1.f. (A e B), C.e.AU2.F2.f. (C e D), C.e.AU2.F3.f. (E e F), C.e.AU2.F4.f. (G e H), C.e.AU2.F5.f. (I e J) e C.e.AU1.F1.f. (L e M), (verso das culturas estão acima e reverso das mesmas estão abaixo), após 15 dias de crescimento em meio BDA a 28°C.....	40
Figura 8 – Aspecto da colônia (A) e microcultivo (B), em um aumento de 1000 vezes, do fungo filamentosso endofítico C.e.A7.F3.c., após dois dias de cultivo, em meio BDA a 28°C.....	41
Figura 9. Identificação molecular com base na análise BLAST do NCBI, de <i>Botryosphaeria rhodina</i> (teleomórfica) e <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (anamórfica), isolado de <i>C. echinata</i>	42
Figura 10. Morfologia macroscópica do endofítico <i>Xylaria multiplex</i> isolado de <i>C. echinata</i> , em meio sólido (BDA), em meio líquido (BD) e micromorfologia (respectivamente), em microscópio óptico, em um aumento de 400 vezes, a 28°C.....	44
Figura 11. Macromorfologia e micromorfologia de conídios, medindo cerca de 15 µ, num aumento de 1000 vezes, de <i>Pestalotiopsis</i> sp. isolado de <i>C. echinata</i> , após 15 dias de crescimento, em meio BDA a 28°C.....	45
Figura 12. Aspecto geral da colônias dos fungos utilizados nos testes de antagonismo: <i>Pythium debaryanum</i> (A), <i>Phytophthora palmivora</i> (B), <i>Pestalotiopsis</i> sp. (C), <i>Phomopsis</i> sp. (D), <i>Rhizoctonia solani</i> (E) e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (F), após 15 dias de cultivo, em meio BDA.....	51
Figura 13. Antagonismo de <i>Botryosphaeria rhodina</i> (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico <i>Pythium debaryanum</i> (A-frente da placa; C-verso da placa), após 3 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – <i>P. debaryanum</i> , nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....	56
Figura 14. Antagonismo de <i>Pestalotiopsis</i> sp. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico <i>Pythium debaryanum</i> (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – <i>P. debaryanum</i> , nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....	56
Figura 15. Antagonismo de <i>Xylaria multiplex</i> (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico <i>Pythium debaryanum</i> (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – <i>P. debaryanum</i> , nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....	57
Figura 16. Redução do crescimento de <i>Pythium debaryanum</i> causada pelos fungos endofíticos de <i>Caesalpinia echinata</i> em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	57

- Figura 17. Antagonismo de C.e.AU2.F4.f. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phytophthora palmivora* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. palmivora*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....59
- Figura 18. Antagonismo de *Xylaria multiplex* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phytophthora palmivora* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. palmivora*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....59
- Figura 19. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phytophthora palmivora* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. palmivora*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....60
- Figura 20. Antagonismo de *Pestalotiopsis* sp. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phytophthora palmivora* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. palmivora*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....60
- Figura 21. Redução do crescimento de *Phytophthora palmivora* causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....61
- Figura 22. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *R. solani*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....62
- Figura 23. Antagonismo de *Xylaria multiplex* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *R. solani*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....63
- Figura 24. Redução do crescimento de *Rhizoctonia solani* causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....64
- Figura 25. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phomopsis* sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 3 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *Phomopsis* sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....65
- Figura 26. Antagonismo de *Pestalotiopsis* sp. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phomopsis* sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *Phomopsis* sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa). Presença de halo de inibição.....66
- Figura 27. Redução do crescimento de *Phomopsis* sp. causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....66
- Figura 28. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 3 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *C. gloeosporioides*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....68
- Figura 29. Antagonismo de *Xylaria multiplex* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *C. gloeosporioides*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....68
- Figura 30. Redução do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....69

Figura 31. Antagonismo de <i>Botryosphaeria rhodina</i> (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico <i>Pestalotiopsis</i> sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 3 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – <i>Pestalotiopsis</i> sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....	71
Figura 32. Antagonismo do endofítico <i>Pestalotiopsis</i> sp. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico <i>Pestalotiopsis</i> sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – <i>Pestalotiopsis</i> sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....	71
Figura 33. Antagonismo do endofítico C.e.AU2.F4.f. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico <i>Pestalotiopsis</i> sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – <i>Pestalotiopsis</i> sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....	72
Figura 34. Antagonismo de <i>Xylaria multiplex</i> (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico <i>Pestalotiopsis</i> sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – <i>Pestalotiopsis</i> sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).....	73
Figura 35. Redução do crescimento de <i>Pestalotiopsis</i> sp. causada pelos fungos endofíticos de <i>Caesalpinia echinata</i> em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	74
Figura 36. Modelo esquemático de extração de compostos químicos do micélio de fungos endofíticos.....	82
Figura 37. Produção de biomassa fúngica de <i>Botryosphaeria rhodina</i> , nos diferentes meios de cultivo: Batata Cenoura, Caldo de Cenoura, Batata Sacarose, Caldo de Batata Doce e Batata Dextrose. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	84
Figura 38. <i>Botryosphaeria rhodina</i> após trinta dias crescimento em meio BD, a temperatura de 28° C, no claro (A) e no escuro (B), sem agitação.....	84
Figura 39. Produção de biomassa fúngica de <i>Botryosphaeria rhodina</i> , no meio BD, nas diferentes condições ambientais: no claro sem agitação, no escuro sem agitação, no claro com agitação e no escuro com agitação. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	85
Figura 40. Produção de biomassa fúngica de <i>Xylaria multiplex</i> , nos diferentes meios de cultivo: Batata Cenoura, Caldo de Cenoura, Caldo de Batata Doce, Batata Sacarose e Batata Dextrose. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	86
Figura 41. <i>Xylaria multiplex</i> após trinta dias crescimento em meio BD, a temperatura de 28° C, no claro (A) e no escuro (B), sem agitação.....	86
Figura 42. Produção de biomassa fúngica de <i>Xylaria multiplex</i> , no meio BD, nas diferentes condições ambientais: no claro sem agitação, no escuro sem agitação, no claro com agitação e no escuro com agitação. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	87
Figura 43. Produção de biomassa fúngica de C.e.A6.F4.c.b, nos diferentes meios de cultivo: Caldo de Cenoura, Batata Cenoura, Caldo de Batata Doce, Batata Sacarose e Batata Dextrose. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	88
Figura 44. C.e.A6.F4.c.b após trinta dias crescimento em meio BD, a temperatura de 28° C, no claro (A) e no escuro (B), sem agitação.....	88
Figura 45. Produção de biomassa fúngica de C.e.A6.F4.c.b, no meio BD, nas diferentes condições ambientais: no claro sem agitação, no escuro sem agitação, no claro com agitação e no escuro com agitação. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	89
Figura 46. <i>Pestalotiopsis</i> sp. após trinta dias crescimento em meio BD, a temperatura de 28° C, no claro (A) e no escuro (B), sem agitação.....	89

Figura 47. Produção de biomassa fúngica de <i>Pestalotiopsis</i> sp., no meio BD, nas diferentes condições ambientais: no claro com agitação, claro sem agitação, no escuro com agitação e no escuro sem agitação. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.....	90
Figura 48. Os discos contendo extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos de <i>C. echinata</i> não apresentaram atividade, na presença de <i>Enterococcus faecalis</i>	92
Figura 49. Os discos contendo os extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos de <i>C. echinata</i> não apresentaram atividade, na presença de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93
Figura 50. Os discos contendo os extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos de <i>C. echinata</i> não apresentaram atividade, na presença de <i>Staphylococcus aureus</i>	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. <i>Primers</i> específicos utilizados na reação de PCR para amplificação do rDNA.....	34
TABELA 2. Condições para amplificação mostrando os reagentes constituintes da reação de PCR.....	35
TABELA 3. Reagentes utilizados na reação para seqüenciamento com suas respectivas quantidades.....	37
TABELA 4. Fungos endofíticos de caules e folhas de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam., escolhidos aleatoriamente.....	38
TABELA 5. Listagem referência de fungos fitopatógenos utilizados nos testes de atividade antifúngica e suas características de patogenicidade. Todos foram incubados em meio BDA, em pH 6,8, a temperatura de 28° C...50	
TABELA 6. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de <i>C. echinata</i> (pau-brasil) e o fitopatógeno <i>Pythium debaryanum</i>	55
TABELA 7. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de <i>C. echinata</i> (pau-brasil) e o fitopatógeno <i>Phytophthora palmivora</i>	58
TABELA 8. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de <i>C. echinata</i> (pau-brasil) e o fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	61
TABELA 9. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de <i>C. echinata</i> (pau-brasil) e o fitopatógeno <i>Phomopsis</i> sp.....	64
TABELA 10. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de <i>C. echinata</i> (pau-brasil) e o fitopatógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	67
TABELA 11. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de <i>C. echinata</i> (pau-brasil) e o fitopatógeno <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	70
TABELA 12. Linhagens referência utilizadas nos testes de atividade antibacteriana.....	82
TABELA 13. Rendimento dos extratos em relação à massa seca do micélio de <i>Botryosphaeria rhodina</i>	91
TABELA 14. Rendimento dos extratos em relação à massa seca do micélio de <i>Xylaria</i> sp.....	91
TABELA 15. Rendimento dos extratos em relação à massa seca do micélio de C.e.A6.F4.c.b.....	91
TABELA 16. Rendimento dos extratos em relação à massa seca do micélio de <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	92

RESUMO

Os microrganismos endofíticos, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior de tecidos vegetais, sem causar-lhes danos aparentes. Assim como outras espécies tropicais, *Caesalpinia echinata* Lam. também abriga diversos endofíticos. Sendo assim o presente trabalho teve como objetivos isolar e caracterizar os fungos endofíticos do pau-brasil, assim como, avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos. As coletas de caules foram realizadas em um fragmento de Mata Atlântica, e as folhas foram coletadas de árvores plantadas, no Campus da Universidade Federal de Alagoas. Houve um predomínio de fungos filamentosos em relação a bactérias, tanto nos caules quanto nas folhas. Através de análises morfológica e molecular alguns fungos endofíticos de *C. echinata* foram identificados, sendo eles: *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex* e *Pestalotiopsis* sp. Dentre todos os isolados, dez deles foram selecionados para testes de antagonismo contra fungos fitopatógenos. Os fungos endofíticos *Pestalotiopsis* sp., *Xylaria multiplex* e *Botryosphaeria rhodina* foram os mais eficazes antagonistas de *Pythium debaryanum* e *Phytoththora palmivora*. Os resultados obtidos no antagonismo *in vitro* evidenciaram a possibilidade da aplicação dos seus respectivos extratos químicos no controle biológico dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento micelial do fitopatógeno *Phomopsis* sp. só foi inibido pelos endofíticos *Botryosphaeria rhodina*, *Pestalotiopsis* sp. e *Xylaria multiplex*. Estes mesmos endofíticos também foram os mais eficazes na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp. *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex*, *Pestalotiopsis* sp. e C.e.A6.F4.c.b. apresentaram uma quantidade maior de biomassa ao crescerem no meio BD, incubados no escuro e sem agitação. Os extratos dos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata*, obtidos a partir de diferentes solventes, não exerceram efeito antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, nas concentrações utilizadas.

ABSTRACT

The endophytic microorganisms in at least one phase of its life cycle inhabit the inner tissues of plants without causing apparent damage. Like other tropical species, *Caesalpinia echinata* Lam has shown several endophytes. Therefore this study aimed to isolate and characterize the endophytic fungi of Brazil wood, as well as assess the antimicrobial activity of extracts. The harvesting of stems has been done in a fragment of Atlantic Forest, and the leaves were harvested from trees growing in the campus of the Universidade Federal de Alagoas. There was a predominance of filamentous fungi compared to bacteria, in both, stems and leaves. By morphological and molecular analyses some endophytic fungi of *C. echinata* were identified, namely: *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex* and *Pestalotiopsis* sp. Among all the isolates ten fungi were selected for tests of antagonism against phytopathogenic fungi. The endophytic fungi *Pestalotiopsis* sp. *Xylaria multiplex* and *Botryosphaeria rhodina* were the most effective antagonists of *Pythium debaryanum* and *Phytoththora palmivora*. These results obtained in *in vitro* experiments support the possibility of the application of chemical extracts of the endophytic *Botryosphaeria rhodina* and *Xylaria multiplex* for the biological control of plant pathogens such as *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides*. The mycelial growth of the pathogenic fungus *Phomopsis* sp. was not inhibited by endophytic *Botryosphaeria rhodina*, *Pestalotiopsis* sp and *Xylaria multiplex*. These same endophytes were also the most effective inhibiting the mycelial growth of phytopathogen *Pestalotiopsis* sp. *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex*, *Pestalotiopsis* sp. and C.e.A6.F4.c.b. have shown a higher amount of biomass when growing in BD medium incubated in the dark and without agitation. Extracts of the endophytic fungi of *Caesalpinia echinata* obtained from different solvents, have not shown antibacterial effect on *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, in the concentrations used.

1. INTRODUÇÃO

Caesalpinia echinata Lam. (pau-brasil) é uma árvore da família Leguminosae, subfamília Caesalpinioidea, nativa da Mata Atlântica, sendo constatada a presença de remanescentes da espécie no Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Alagoas (Lima, 1992). Assim como outras espécies de plantas, *C. echinata* abriga diversos microrganismos endofíticos. Segundo Petrini (1991), são assim considerados os microrganismos que coabitam os vegetais sem aparentemente causar-lhes alguma patogenicidade.

Pouco se conhece a respeito dos aspectos ecológicos, fisiológicos e genéticos envolvidos na interação planta-microrganismo endofítico, principalmente em plantas tropicais. No século XX, os estudos sobre estes microrganismos intensificaram-se a partir dos anos oitenta, visando o entendimento dessa associação simbiótica e a utilização destes microrganismos em processos biotecnológicos, para promover o aumento da produção vegetal ou como fonte para prospecção de novos compostos bioativos, ou ainda, atuando como eliciadores bióticos na produção de compostos de alto valor agregado. Estudos já demonstram que os fungos endofíticos são fontes promissoras de metabólitos secundários, com potente atividade antitumoral e antimicrobiana (Azevedo, 1998; Azevedo et al., 2000; Strobel, 2003). Muitos endofíticos de plantas economicamente importantes já foram estudados, mas ainda há um grande número de plantas a serem pesquisadas nesse sentido.

Atualmente, tem sido estudada e incentivada a utilização de microrganismos endofíticos visando o tratamento de doenças de plantas, evitando assim a utilização de produtos químicos que causam danos irreversíveis ao meio ambiente (Benítez et al., 2004; Schulz et al., 2002; Mejía et al., 2008; Bailey et al., 2008). A importância desses microrganismos intensifica a necessidade de conservação das espécies vegetais que os abrigam, a exemplo da *C. echinata* Lam. que ainda faz parte da Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (Brasil 1992). Em 1978 foi publicada, no Diário Oficial da União, a Lei nº 6.607 declarando o pau-brasil como “Árvore Nacional” do Brasil, e instituindo o dia 03 de maio como o dia do pau-brasil.

A escolha dessa espécie para a presente pesquisa deveu-se tanto a sua importância histórica, quanto ao fato da mesma encontrar-se ainda ameaçada de extinção e por haver estudos recentes da utilização de seus extratos no combate a tumores cancerígenos em camundongos. No estudo desenvolvido por Rocha (2004) são citadas algumas propriedades

medicinais do pau-brasil, dentre elas: adstringente, anti-sifilico, contra diabetes, para regulação menstrual e anticancerígeno.

O presente trabalho, portanto, contribuirá para o conhecimento da microbiota fúngica isolável em meios convencionais, presente no interior de *C. echinata*, além de identificá-los por técnicas moleculares baseadas na análise do gene 18S rRNA, podendo assim revelar aspectos importantes, tanto do ponto de vista acadêmico quanto biotecnológico. Além disso, também é alvo deste estudo a caracterização dos principais componentes desta microbiota e seu papel na biossíntese de metabólitos secundários e como agente inibidor de outros microrganismos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi isolar e caracterizar os fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae), além de avaliar sua atividade antimicrobiana.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar fungos endofíticos de tecidos sadios de *Caesalpinia echinata* Lam.;
- Identificar os fungos endofíticos isolados;
- Verificar a ocorrência de antagonismo de alguns isolados frente a fitopatógenos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Botânica e considerações sobre *Caesalpinia echinata* Lam.

Caesalpinia echinata Lam. (Figura 1) é uma árvore nativa da Mata Atlântica conhecida popularmente como pau-brasil, sendo encontrada nas partes mais secas da floresta. Essa espécie ocorre desde o Ceará até o Rio de Janeiro, sendo mais freqüente no sul da Bahia. A árvore mede de 10-12 m de altura, sendo encontrados exemplares de até 30 m, com troncos de 40-70 cm de diâmetro. Possui uma copa irregular; os ramos novos e as cascas dos indivíduos mais jovens são cobertos por acúleos. Possui um cerne duro e pesado, com coloração que varia de castanho alaranjado ao vermelho escuro. Sua madeira foi a primeira riqueza econômica a ser explorada no território brasileiro pelos colonizadores portugueses. Possui um albúrnio amarelo claro. Suas folhas são compostas e bipinadas. Suas flores possuem pétalas amarelo-sulfúreas, existindo uma mácula vinosa no centro da pétala dorsal. Possui um perfume intenso e agradável. Seus frutos recobertos por espinhos possuem de uma a quatro sementes castanhas (Corrêa, 1984). *Caesalpinia echinata* também é conhecida como ibirapitanga, orabutã, brasileto, ibirapiranga, ibirapita, ibirapitã, muirapiranga, pau-rosado e pau-de-pernambuco (ambientebrasil, 2006).

Sua madeira atualmente é utilizada para confeccionar arcos de violino, mas no passado foi utilizada na construção civil e naval. Antes do advento dos corantes sintéticos, seu principal valor consistia na produção de um corante, conhecido como brasileína, que era extraído do lenho da planta, sendo utilizado para tingir tecidos e fabricar tinta de escrever (Lorenzi, 2000).



Figura 1. Árvore da espécie *Caesalpinia echinata* (A), detalhe do fruto (B) e da flor (C).

Os corantes sintéticos substituíram a utilização do pau-brasil na fabricação de corantes, mas a espécie ainda é bastante utilizada na arborização urbana e na fabricação de instrumentos musicais (Ramalho, 1978; Aguiar e Barbosa, 1985; Soares, 1985). Do conhecimento das propriedades químicas de *C. echinata*, além da brasileína (1) há a brasilina (2) presente no cerne da madeira (Rizzini, 1978). Oliveira et al. (2002) estudaram o espectro vibracional desses dois compostos (Figura 2).

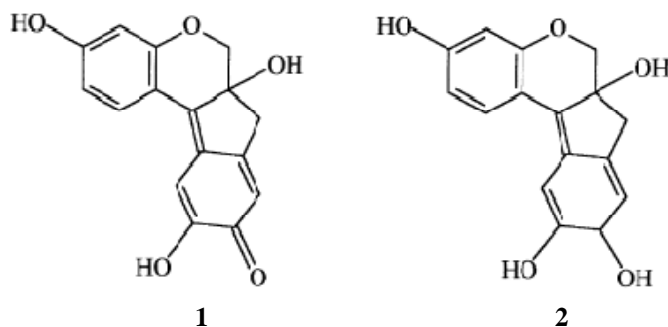


Figura 2. Fórmula estrutural da brasileína (1) e da brasilina (2), compostos oriundos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Oliveira et al., 2002).

O fato da madeira de pau-brasil ser pesada, dura e com o cerne de coloração vermelha foram motivos que levaram ao extrativismo exagerado, o que colocou a espécie em perigo de extinção. Além disso, existem lacunas no conhecimento referente a sua multiplicação (Mainieri, 1960). A curta viabilidade de suas sementes também tem contribuído à ameaça de sua extinção. Barbedo et al. (2002) estudaram a tolerância à dessecação e armazenamento das sementes de pau-brasil, observando que estas são tolerantes à dessecação, mas a secagem pode ser influenciada pela qualidade inicial da semente. Foi constatado também que quando as sementes são armazenadas nas condições normais do ambiente tendem a perder a viabilidade em menos de três meses, mas sob temperatura baixa tornam-se viáveis por até dezoito meses, com um índice de germinação superior a 80%. Assim, foi concluído que *C. echinata* comporta-se como uma espécie ortodoxa, tolerando dessecação até atingir 7,6% de água, o que contribui para o armazenamento e amplia o potencial de conservação da espécie. Aguiar et al. (2005) avaliaram a germinação das sementes e o crescimento das mudas sob condições de sombreamento, concluindo que a germinação e o índice de velocidade de emergência das sementes de *C. echinata* não sofreram influência dos níveis de sombreamento testados, mas em relação à formação de mudas, houve uma tendência para um maior desenvolvimento com a diminuição dos níveis de sombreamento.

Uma possível forma de livrar o pau-brasil da extinção é a conservação *ex situ* da espécie, utilizando-a na arborização e paisagismo de ambientes urbanos, uma vez que a espécie possui um potencial ornamental, com porte elegante, copa arredondada, folhas cor verde-brilhante e flores em cacho amarelo-ouro suavemente perfumadas (Lima et al., 2002; Rocha, 2004). Mas, as plantas quando são submetidas ao ambiente urbano podem desenvolver estresse oxidativo, levando à estimulação de antioxidantes como ácido ascórbico, tióis, peroxidases e superóxido dismutase. Bulbovas et al. (2005) buscaram conhecer o perfil dessas defesas em folhas de plantas jovens de *C. echinata* com diferentes graus de desenvolvimento. Eles avaliaram os antioxidantes e a glutatona em 130 plantas mantidas em casa de vegetação, com temperatura, umidade relativa e irradiância controladas. Foi constatado que em geral a concentração de ácido ascórbico e a atividade das peroxidases foram altas em *C. echinata* ao compará-la com outras espécies arbóreas tropicais. Foi verificado também variações nas defesas durante os dezoito meses do experimento, observando que a concentração de glutatona e a atividade da peroxidase poderiam ser influenciadas por mudanças na temperatura e a produção de superóxido dismutase foi estimulada em resposta à temperatura e à umidade relativa. Rocha e Barbedo (2008) realizaram uma pesquisa a respeito da utilização do pau-brasil, na arborização urbana, em São Paulo, Rio de Janeiro e Recife, o que levou a formação de um banco de dados detalhado, que contribuirá para o manejo adequado dessas árvores, mantendo sua importância para a conservação *ex situ* da espécie no ambiente urbano e propiciando o contato da população com a árvore nacional brasileira.

Rezende et al. (2004) fizeram o primeiro relato da composição química dos constituintes voláteis das folhas e flores de *C. echinata*. Neste foi isolado o E- β -ocimeno (3) como constituinte majoritário do extrato das flores, e em menor proporção foram isolados outros terpenos, tais como, mirceno (4), linalol (5) e neo-allo-ocimeno (6). Um grupo de derivados C₆ também foi identificado, contendo n-hexanal (7), (E)-2-hexenal (8), (Z)-3-hexenol (9) e 1-hexanol (10). Houve também a presença de alguns compostos nitrogenados como o indol (11) e o antranilato de metila (12). Do óleo essencial obtido das folhas frescas, o constituinte majoritário foi o (E)-3-hexeno-1-ol (13). Os compostos fenólicos é a classe de metabólitos mais representada, destacando-se a vanilina (14), 2-metoxi-4-vinilfenol (15) e álcool benzílico (16). Outros compostos estavam presentes, em menor proporção, como: benzaldeído (17), acetofenona (18), β -feniletanol (19), salicilato de metila (20) e ácido o-hidroxicinâmico (21).

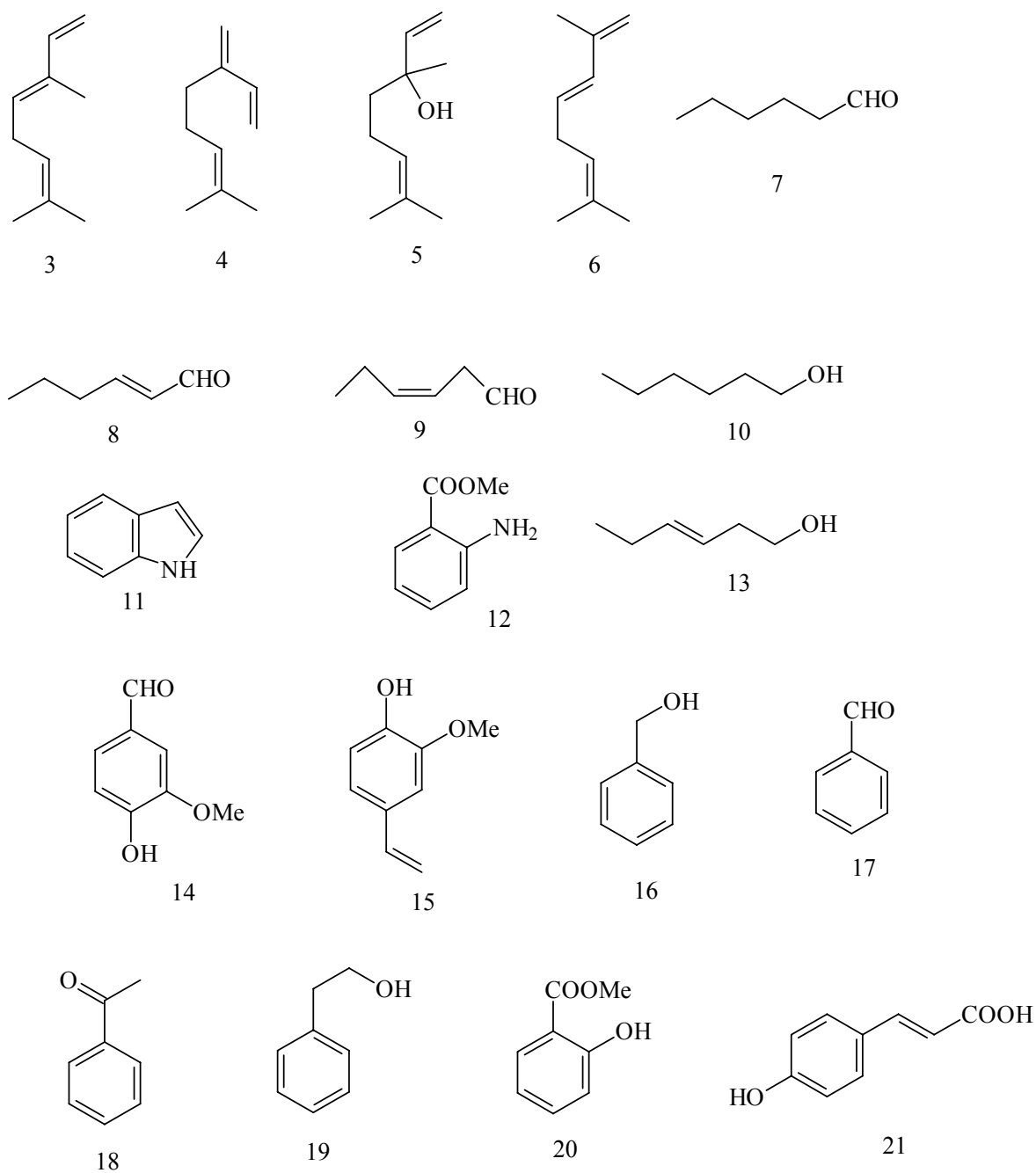


Figura 3. Fórmulas estruturais dos constituintes voláteis das folhas e flores de *Caesalpinia echinata* Lam. (Rezende et al., 2004).

3.2. Microrganismos endofíticos

3.2.1. Considerações gerais

Durante as últimas quatro 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 de plantas, 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 et al., 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 tem haver 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 et al., 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 et al. (2002) isolaram 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 et al., 2008).

A potencialidade herbicida dos metabólitos produzidos por endofíticos está sendo testada. Santos et al. (2008) testaram 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 daninhas, *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 et al. (2009) isolaram 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 et al. (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 et al. (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 frequentes. 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 frequentes destacaram-se *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Botryosphaeria* (Camatti-Sartori et al., 2005).

Metabólitos com atividade antimicrobiana têm sido produzidos por um grande número de fungos endofíticos isolados de diversas plantas. Embora muitas plantas economicamente importantes tenham sido analisadas quanto à presença de endofitos, outras tantas ainda não receberam a atenção devida. Entre estas plantas está a *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), que

ainda não foi estudada sob condições *in vitro* na forma de tecidos cultivados, nem pelo seu conteúdo em microrganismos endofíticos e os metabólitos por eles produzidos. Por se tratar de uma planta característica de floresta de clima tropical e levando em conta que os microrganismos endofíticos são específicos e diferentes para cada espécie, espera-se encontrar microrganismos, com bagagens genéticas inéditas, capazes de produzirem compostos especiais importantes.

3.2.2. 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 por 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. (1993) 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. guepinii* isolado de *Wollemia nobilis* W. G. Jones, K. D. Hill & J. M. Allen (Strobel et al., 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; 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; Tao, 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 et al., 2004). Temos outro exemplo, como derivados do ácido giberélico que é produzido pela planta *Curcubita maxima* Duch., tendo sido também isolado do fungo *Gibberela fugikuroi* que vive associado a essa planta (Stowe; Yamaki, 1957).

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 et al. (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 et al. (2000) isolaram 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 et al. (2001) isolaram 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 et al., 2001).

Da espécie *Symphytum officinale* L., conhecida popularmente como confrei, Pileggi et al. (2002) isolaram 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 et al., 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 et al., 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 et al., 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*, *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum* (Wang et al., 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; 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 *Curvularialunata* 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).

O composto gentiopicrin foi produzido por um fungo endofítico, isolado da planta *Gentiana macrophylla* Root, usada na medicina chinesa há 2000 anos (Yin et al., 2009).

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).

3.2.3. Endofíticos produtores de substâncias antimicrobianas

Várias classes químicas, como alcalóides, citocalasinas, esteróides, fenilpropanóides, fenóis, flavonóides, isocumarinas, quinonas, xantonas, compostos alifáticos e clorados, têm sido representadas nos metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos (Tan; Zou, 2001; Schulz; Boyle, 2005). Esses compostos têm exibido diversas atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, algicida, antimalarial e herbicida.

Dos extratos obtidos de espécies do gênero *Pezizula* foram isoladas as seguintes substâncias: (R)-meleina, (-)-micorrizina A, 2-metoxi-4-hidroxi-6-metoximetilbenzaldeído, (+)-criptosporiopsina e 4-epi-etiosolideo. Esses metabólitos secundários apresentaram forte atividade fungicida e herbicida, e em menor grau atividade algicida e antibacteriana (Schulz et al., 1995).

Do fungo endofítico *Phomopsis* sp. foi isolado o antibiótico fomopsicalasina, com atividade contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus* e *Candida tropicalis* (Horn et al., 1995).

O extrato orgânico de *Pestalotiopsis microspora* exibiu uma zona de inibição contra a bactéria *Bacillus subtilis*. Desse endofítico foi isolado o ácido torreiano que foi testado *in vitro* contra linhagens de células cancerígenas humanas, demonstrando ser de 5 a 10 vezes mais potente contra as células cancerígenas do que a proteína quinase C (Lee et al., 1996).

Calistru, McLean e Berjak (1997) estudaram a produção de metabólitos por duas espécies de fungos Trichodermas, *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum* e realizaram testes antimicrobianos com os extratos das culturas. Ambos inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que os extratos de *T. viride* apresentaram um efeito inibitório bem maior. A atividade enzimática extracelular de *Trichoderma* spp. foi associada a inibição do crescimento *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus*.

Pelaéz et al. (1998) isolaram 152 fungos endofíticos de nove plantas cultivadas em solo salino e com gesso, sendo as espécies *Alternaria alternata*, *Sporormiella intermedia*,

Rhizoctonia sp., *Epicoccum purpurascens*, *Pleospora herbarum*, *Cladosporium herbarum*, *Sporormiella australis* as mais frequentes. Foi observada a capacidade de produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, realizando testes com bactérias e leveduras patogênicas humanas. Verificaram que 70% dos extratos fúngicos inibiram o crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* e apenas um composto, produzido pelo endofítico *Sporormiella grandispora*, inibiu o crescimento da bactéria *Enterococcus faecium*.

Um novo pentacetídeo agente antifúngico foi isolado do fungo endofítico *Fusarium* sp., nos ensaios esse composto demonstrou potente atividade contra *Candida albicans* (Brady; Clardy, 2000).

Da planta *Quercus* sp. foi isolado o fungo endofítico *Cytonaema* sp. Esse fungo produziu os ácidos cítonicos A e B com capacidade inibitória contra o citomegalovírus, um oportunista patogênico humano (Guo et al., 2000).

Rodrigues et al. (2000) testaram os extratos produzidos pelos fungos endofíticos de *Spondias mombin* contra actinomicetos, leveduras, fungos filamentosos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores verificaram que os extratos de *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* inibiram o crescimento de actinomicetos, sendo que os extratos de *Guignardia* sp. também foram ativos contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp., e *Penicillium canadensis*. Os extratos de *P. guepinii* apresentaram atividade contra *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto os extratos de *Phomopsis* sp. inibiram os fungos patogênicos *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*.

De alguns gêneros de orquídeas, Scrugli et al. (2000) obtiveram raízes que foram investigadas quanto à presença de endofíticos. Os fungos isolados foram testados contra os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. Os endofíticos que foram isolados das orquídeas pertencentes ao gênero *Barlia* apresentaram amplo espectro de ação antimicrobiana, enquanto os isolados do gênero *Limodorum* apresentaram atividade bastante específica, contra apenas um tipo de microrganismo patógeno.

Da *Artemisia mongolica* Fisch. ex Besser, Zou et al. (2000) isolaram o fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* de cuja cultura obteve-se o ácido coletótrico com ação antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Helminthosporium sativum*.

Liu et al. (2001) avaliaram a atividade dos extratos das culturas de 39 fungos endofíticos isolados de *Artemisia annua* L., verificando que a maioria dos extratos possuíam substâncias ativas contra fungos fitopatogênicos.

Jesterona e hidroxijesterona foram dois novos compostos produzidos pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis jesteri*. Ambos apresentaram atividade antimicótica, porém os resustados obtidos de jesterona foram melhores. Nos testes, o fungo basidiomiceto *Rhizoctonia solani* e o ascomiceto *Pyricularia oryzae* foram sensíveis apenas a jesterona. E este composto também foi ativo contra os fungos oomicetos *Pythium ultimum*, *Aphanomyces* sp., *Phytophthora citrophthora* e *P. cinnamomi* (Li; Strobel, 2001).

Do fungo endofítico *Phomopsis* sp. foram isoladas duas novas xantonas, fomoxantonas A e B. Estes dois compostos exibiram significativa atividade contra *Plasmodium falciparum* e *Mycobacterium tuberculosis* (Isaka et al., 2001).

De *Pestalotiopsis* spp. e de *Monochaetia* sp., endofíticos associados a muitas espécies de plantas tropicais, foi isolado o ácido ambuic que nos testes de atividade antimicrobiana demonstrou atividade contra várias espécies de *Fusarium*, *Diplodia natalensis*, *Cephalosporium gramineum* e *Pythium ultimum* (Li et al., 2001).

Muscodor albus obtido de *Cinnamomum zeylanicum* Blume produz uma mistura de compostos voláteis antimicrobianos capazes de inibir e matar diversos fungos e bactérias fitopatogênicos, como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium ultimum*, entre outros (Strobel et al., 2001). Esse mesmo endofítico foi isolado em outras plantas, no norte da Austrália, incluindo *Grevillea pteridifolia* Knight, *Kennedia nigriscans* Lindl. e *Terminalia prostrata* Pedley. Os compostos orgânicos voláteis produzidos diferiram do extrato original de *Muscodor albus* isolado de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, em virtude da produção de naftaleno e outros compostos, mas nos bioensaios envolvendo diversos microrganismos, apresentaram grande atividade biológica contra fungos e bactérias (Ezra et al., 2004a). A descoberta de compostos voláteis isolados de endofíticos, com atividade antifúngica, indica possíveis utilizações desses compostos na agricultura, por meio de microfumigação, e até mesmo o uso no tratamento de micoses em seres humanos (Strobel, 2003).

Da planta *Terminalia morobensis* foi isolado o endofítico *Pestalotiopsis microspora*. Este fungo produziu um composto identificado como isopestacin, com atividade antioxidante e antifúngica. O isopestacina reduziu em 100% o crescimento dos fungos *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* (Strobel et al., 2002).

Schulz et al. (2002) realizaram uma revisão sobre os fungos endofíticos como uma nova fonte de metabólitos secundários, biologicamente ativos. Ao comparar os fungos

isolados de algas, de plantas e do solo, verificaram que nos testes de atividade antibacteriana, fungicida, algicida e herbicida, 83% dos endofíticos de algas e 80% dos endofíticos de plantas exibiram pelo menos uma das atividades, comparado a 64% dos fungos do solo. Os autores demonstraram que a proporção de novos compostos produzidos por endofíticos, cujas estruturas ainda não foram elucidadas (51%) é relativamente maior que a produção por isolados do solo (38%).

Um endofítico do gênero *Streptomyces* sp. foi isolado a partir de *Grevillea pteridifolia* Knight, uma pteridófito, por Castillo et al. (2003). Da cultura do endofítico foi produzido cacadumicina A, um novo e potente antibiótico com atividade frente às bactérias Gram-positivas, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. O cacadumicina A também foi ativo contra o *Plasmodium falciparum*, causador da malária e contra o câncer de mama humano.

Das folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme, conhecida vulgarmente como rabo-de-macaco, Pinto (2003) isolou 36 microrganismos endofíticos, dos quais 24 foram fungos filamentosos. Dos fungos isolados, 10 apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli*, *Candida albicans*, *Candida* spp. e *Aspergillus niger*.

O fungo endofítico *Gliocladium* sp. isolado de *Eucryphia cordifolia* Cav. produziu um composto orgânico volátil, letal para os fitopatógenos *Pythium ultimum* e *Verticillium dahliae* (Stinson et al., 2003).

Do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora*, Harper et al. (2003) isolaram um composto denominado pestacina que exibiu propriedades antifúngicas e antioxidantes.

Três novos derivados de dihidroisocumarina foram produzidos pelo fungo endofítico *Geotrichum* sp., isolado da planta *Crassocephalum crepidioides* S. Moore. Esses novos compostos apresentaram atividades antimalarial, antituberculose e antifúngica (Kongsaeree et al., 2003).

Da planta *Monstera* sp., da região da Amazônia peruana, Ezra et al. (2004b) isolaram o endofítico *Streptomyces* sp. que produziu um composto denominado coronamicina. Nos testes contra patógenos humanos, essa substância foi ativa contra o fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans* e contra o parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum*.

Souza et al. (2004) isolaram endofíticos das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* DC. e *Strychnos cogens* Benth. Dos endófitos isolados de *P. longiflora* foram identificados os fungos: *Colletotrichum* sp. e seu telemorfo *Glomerella* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger*, *Phomopsis* sp. e *Xylaria* sp. de *S. cogens* foram isolados e identificados os

fungos endofíticos: *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. Uma amostra de 79 isolados fúngicos teve seus metabólitos extracelulares bioensaiados contra microrganismos patogênicos e fitopatogênicos. Desses isolados, dezenove inibiram um ou mais microrganismos-teste.

Uetanabaro (2004) isolou actinomicetos endofíticos de *Tocoyena formosa* K. Schum e verificou que alguns isolados do gênero *Microbispora* apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Uma linhagem apresentou atividade antifúngica frente ao *Aspergillus niger*.

Das folhas sadias de *Cynodon dactylon* (L.) Pers., Liu et al. (2004) isolaram pela primeira vez o fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* CY018, do qual foram extraídos dois novos metabólitos, asperfumoide e asperfumina, além de outros seis compostos bioativos. Os autores realizaram testes com esses metabólitos utilizando os fungos patogênicos humano *Candida albicans*, *Tricophyton rubrum* e *Aspergillus niger*. Asperfumoides e outros quatro compostos inibiram o crescimento de *Candida albicans*.

Rhizoctonia sp. foi isolado como endofítico, presente nas folhas de *Cynodon dactylon* (L.) Pers., e de sua cultura foram extraídos cinco compostos, destes uma nova benzofenona, denominado de ácido rhizoctonico que apresentou atividade contra *Helicobacter pylori* (Ma et al., 2004).

Almeida et al. (2005) isolaram e identificaram a microbiota fúngica endofítica de ápices caulinares de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), cultivada *in vivo* e *in vitro*. Os endofíticos isolados do cultivo *in vitro* foram: *Fusarium oxysporum*, *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum*; os das plantas *in vivo*, foram: *Fusarium* sp., *F. Proliferatum*, *F. Oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria gaisen*, *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum*. Estes sete endofíticos foram reintroduzidos *in vitro* na planta hospedeira. *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum* foram os únicos que permaneceram como endofíticos, os demais comportaram-se como patógenos, diminuindo o desenvolvimento das plântulas em relação às plantas sem inoculação. Sendo assim, *E. nigrum* e *Neotyphodium* sp. podem ser utilizados como agentes de controle biológico dos patógenos de pupunheira.

Cafêu et al. (2005) realizando o estudo químico dos extratos produzidos pelo fungo *Xylaria* sp., isolaram substâncias com atividade antifúngica em potencial e de interesse comercial. Os pesquisadores relataram pela primeira vez as substâncias 7-cloro-griseofulvina, citocalasina B e griseofulvina sendo produzidas por um fungo endofítico do gênero *Xylaria*, e também isolaram ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico e citocalasina D que já haviam sido

relatadas como metabólitos de *Xylaria* sp., mas essa foi a primeira vez como compostos produzidos por um fungo endofítico.

De *Acanthus ilicifolius* L. e *Acrostichum aureum* L., duas espécies do manguezal da costa sudoeste da Índia, foram isolados catorze fungos endofíticos que foram testados contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*, e contra os fungos *Candida albicans* e *Trichophyton metagrophytes*. Os fungos endofíticos *Cumulospora marina* e *Pestalotiopsis* sp. demonstraram considerável inibição frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Duas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. e *Pestalotiopsis* sp. inibiram várias bactérias e *C. albicans*. Além da atividade antimicrobiana, todos os fungos produziram enzimas extracelulares (Maria et al., 2005).

Dos frutos de *Melia azedarach* L. foi isolado o fungo endofítico *Penicillium janthinellum*. Da cultura desse fungo foi isolada uma nova antraquinona, denominada jantinona e outros policetídeos conhecidos, dentre eles citrinina que inibiu em 100% o crescimento do protozoário *Leishmania mexicana* (Marinho et al., 2005).

Inácio et al. (2006) relataram pela primeira vez o fungo *Colletotrichum gloesporioides* como um endofítico, tendo sido isolado de *Cryptocarya mandioccana*, uma espécie da Mata Atlântica. Verificaram que os compostos produzidos por esse endofítico apresentaram forte atividade antifúngica contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

Fungos endofíticos de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) e de cupuaçuzeiros (*Theobroma grandiflorum* Schum.) com potencial de controlar a podridão-parda no cacau, causada pelo fitopatógeno *Phytophthora palmivora*, foram isolados e selecionados por Hanada (2006). Dos endofíticos testados *Trichoderma viride* foi o mais eficiente no controle da doença.

Guimarães (2006) ao realizar a prospecção química e biológica em endofíticos associados a *Viguiera arenaria* Baker, verificou que extratos obtidos desses microrganismos demonstraram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. E dois extratos foram promissores frente às enzimas gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e adenina-fosforribosil-transferase de *Leshmania tarentolae*.

A análise da diversidade genética, antimicrobiana e celulolítica de endofíticos da rizosfera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foi estudada por Nascimento (2006). Dos fungos endofíticos isolados 16% apresentaram atividade antimicrobiana contra os fungos fitopatógenos de cana-de-açúcar.

Weber et al. (2007) isolaram de frutos e do solo fungos endofíticos das divisões Ascomycota e Basidiomycota. Dos extratos obtidos desses endofíticos verificaram que os compostos produzidos possuíam atividade contra o patógeno *Candida albicans*, sendo que na divisão Ascomycota houve uma proporção maior de endofíticos com atividade antifúngica.

O fungo *Acremonium* sp. foi isolado, por Hussain et al. (2007), como endofítico de *Plantago lanceolata* L. Da cultura desse fungo foi extraído o composto djalonensona, sendo testada a sua atividade herbicida, antibacteriana e antifúngica. Djalonensona demonstrou uma forte atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Microbotryum violaceum*.

O fungo endofítico *Botryosphaeria mamane*, isolado de *Garcinia mangostana*, produziu um novo dihidrobenzofurano, o botryomaman e mais seis compostos. Dentre estes, primina exibiu a melhor atividade contra *Staphylococcus aureus* (Pongcharoen et al., 2007).

Oito diferentes policetídeos foram produzidos por espécies de *Penicillium* isolados das plantas *Melia azedarach* L. e *Murraya paniculata* (L.) Jack. As substâncias identificadas como citrinina 5 e citrinina H-1 foram testadas frente às bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Citrinina H-1 apresentou efeito bactericida em relação a *E. coli*, diferindo da citrinina que só apresentou efeito bactericida em concentrações acima de 500 µg mL⁻¹. Em relação às demais bactérias a atividade de ambas foi similar. Os demais compostos foram biologicamente ativos (Pastre et al., 2007).

Das flores de *Urospermum picroides* F. W. Schmidt, uma planta medicinal que possui atividade citotóxica, Aly et al. (2008) isolaram o fungo endofítico *Ampelomyces* sp. e testaram a atividade antimicrobiana do extrato fúngico. Dos catorze compostos identificados, doze inibiram os microrganismos patógenos *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis*.

Do gênero *Theobroma*, Bailey et al. (2008) isolaram endofíticos candidatos ao biocontrole de doenças do cacau. Sendo quinze isolados do gênero *Trichoderma* e um isolado da espécie *Colletotrichum gloeosporioides*. Os isolados variaram em suas capacidades para produzir metabólitos com capacidade de inibir o crescimento de *Moniliophthora roreri*. Os melhores resultados foram demonstrados por *Trichoderma* TKON21 e *T. ovalisporum* que inibiram completamente o crescimento de *M. roreri*. *Colletotrichum gloeosporioides* também foi isolado por Mejía et al. (2008), juntamente com os endofíticos *Clonostachys rosea* e *Botryosphaeria ribis* a partir de tecidos saudáveis de *Theobroma cacao* (cacau). Esses endofíticos demonstraram um bom antagonismo contra *Moniliophthora roreri*, *M. perniciosa* e *Phytophthora palmivora*, os principais patógenos do cacau. No ensaio em campo, a presença

de *C. gloeosporioides* reduziu a porcentagem de frutos infectados por *P. palmivora* em três de cada quatro fazendas.

De *Dillenia indica* Blanco, uma árvore tropical, foi isolado um fungo endofítico, identificado como *Hypocrea* spp. NSF-08, sendo um gênero telemórfico de *Trichoderma*. Os compostos obtidos a partir dos extratos desse fungo inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Fusarium oxysporum* (Gogoi et al., 2008).

Da cultura do fungo endofítico *Pestalotiopsis adusta*, Li et al. (2008) isolaram três novos compostos derivados de benzofenona clorada, sendo denominados de pestalocloretos A, B e C. Pestalocloreto A demonstrou uma potente atividade antifúngica contra *Fusarium culmorum* e pestalocloreto B exibiu uma extraordinária atividade contra *Gibberella zeae* e *Verticillium albo-atrum*.

O fungo endofítico *Phomopsis* sp. PSU-D15, isolado das folhas de *Garcinia dulcis*, produziu três novos metabólitos, um deles, o pomoenamida apresentou *in vitro* uma moderada atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Rukachaisirikul et al., 2008).

Do fungo endofítico *Pestalotiopsis fici*, Liu et al. (2008) isolaram cinco novos compostos derivados do ciclopropano, denominados de pestaloficióis A-E (1-5). Os pestaloficióis 1, 2 e 4 demonstraram efeito inibitório contra a replicação do vírus HIV-1 em determinadas células.

Pestafolideo A e pestafitalideos A e B foram novos compostos isolados a partir do fungo endofítico *Pestalotiopsis foedan*. Os três compostos apresentaram atividade antifúngica moderada frente aos patógenos *Candida albicans*, *Geotrichum candidum* e *Aspergillus fumigatus* (Ding et al., 2008).

3.2.4. 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; Azevedo, 1998).

Mariano (1993) cita que 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.

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 subseqüentes com papel celofane, placas sobrepostas, inibição de germinação de esporos, antagonismo em

folhas destacadas e em mudas. Os autores concluíram que os isolados de *Bacillus* sp. foram mais antagonísticos a *Cylindrocladium spathulatum* que os de *Trichoderma*.

Buscando o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro, 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.

O antagonismo de *Pseudomonas putida* biovar A, *P. putida* biovar B, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Flavobacterium* sp. contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*, fungos fitopatógenos responsáveis pela podridão radicular dos citros, foi avaliado por Amorim e Melo (2002). *In vitro*, os isolados bacterianos *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium* sp. e *Pseudomonas putida* biovar A foram os mais ativos inibidores do crescimento micelial de *Phytophthora*.

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 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 pernicioso*, 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*, *Lasiodiplodia 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 pernicioso*. 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 antagonístico 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 et al. (2007) avaliaram 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*.

Assumpção et al. (2009) isolaram, caracterizaram e identificaram a comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. Durante a avaliação biotecnológica dos isolados, os pesquisadores testaram as bactérias endofíticas *in vitro* quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos, síntese de ácido indolacético (AIA) e solubilização de fosfato. Observaram que 18% dos isolados controlaram o crescimento de fungos fitopatogênicos, 100% produziram AIA, e 39% solubilizaram fosfato.

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* and *Candida tropicalis*) apresentaram os melhores resultados, exibindo 46,6% a 50% de redução no crescimento micelial do fitopatógeno.

4. CAPÍTULO I: Isolamento e caracterização morfológica e molecular de fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam.

4.1. Introdução

Os endofíticos são microrganismos que penetram na planta e passam a viver em seu interior sem causar-lhes danos aparentes, uma vez que os mesmos podem causar infecções assintomáticas nos tecidos internos das plantas. E muitos endofíticos para determinadas espécies de plantas, podem ser patógenos para outras tantas espécies. Muitos trabalhos têm descrito que os endofíticos são benéficos às plantas nas quais habitam, fornecendo-lhes proteção contra ataques de insetos, de animais herbívoros e de microrganismos fitopatogênicos, enquanto a hospedeira fornece-lhes principalmente alimento. Mas essa relação simbiótica pode ser afetada, por algum desequilíbrio ambiental ou mesmo a própria sanidade da planta, o que pode levar um endofítico a comportar-se como patógeno. Essas relações têm aumentado o interesse no estudo da importância desses microrganismos, principalmente no que diz respeito à produção de metabólitos secundários (Carrol, 1988; Petrini, 1991; Azevedo et al., 2000).

Em diversas regiões do planeta, um número muito grande de microrganismos endofíticos têm sido isolados, mas ainda há muitas espécies a serem descobertas e identificadas. Devido à alta diversidade vegetal nas florestas tropicais, deve haver uma variedade expressiva de endofíticos a serem isolados. Entretanto são poucos os trabalhos publicados em relação a endofíticos isolados de espécies nativas das florestas tropicais.

A desinfestação é uma etapa crucial no isolamento de endofíticos. São várias as substâncias desinfetantes utilizadas em trabalhos com esses microrganismos, sendo bastante comum o uso do hipoclorito de sódio. Contudo, deve haver uma preocupação em relação a concentração e o tempo de utilização desse desinfetante, de acordo com as partes do vegetal que serão utilizadas (Blanco, 1999).

Outra etapa muito importante é a identificação dos microrganismos isolados. Muitos endofíticos formam colônias com um aspecto macroscópico bastante característico da espécie, o que leva facilmente a uma identificação a nível de gênero. Outros são identificados por meio de suas estruturas de reprodução. Atualmente, a análise da sequência do RNA ribossomal tem sido empregada na identificação genética desses microrganismos. Utilizando

esses recursos, os endofíticos isolados no presente estudo foram caracterizados e identificados.

4.2. Material e Métodos

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Biotecnologia de Plantas e de Microrganismos Endofíticos, do Instituto de Química e Biotecnologia, e de Genética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, ambos da Universidade Federal de Alagoas.

4.2.1. Material vegetal

Foram utilizados microrganismos isolados de árvores da espécie *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), que foram identificadas no trabalho de Machado (2003), encontradas em uma área de Mata Atlântica, no município de Coruripe, no sul do Estado de Alagoas (Latitude 10°2'37'' e Longitude 36°16'20''), e no Campus A. C. Simões, da Universidade Federal de Alagoas (Latitude 9°28'42'' e Longitude 35°34'55''). Para a coleta, foi realizada uma seleção aleatória das plantas adultas, sendo escolhidos caules e folhas de aspectos jovens e sadios.

4.2.2. Meios de cultura

4.2.2.1. Ágar-Água (Kelman et al., 1967):

Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

O ágar foi fundido em 500 mL de água destilada, usando um forno de microondas. Em seguida ajustou-se o volume com água destilada para 1000 mL. Esterilizou em autoclave a 120° C, durante 20 minutos.

4.2.2.2. Batata, Dextrose e Ágar (BDA) (Riker & Riker, 1936):

Discos de batata inglesa descascada	200 g
Dextrose	20 g
Água destilada	1000 mL
Ágar	17 g
pH	6,8

Os discos de batata foram fervidos em 500 mL de água destilada por 30 minutos. Após filtração através de gaze, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 mol.L⁻¹ antes de adicionar o ágar.

4.2.2.3. Meio Cenoura Ágar (CA) (Tuite, 1969):

Cenoura triturada	20 g
Ágar	17 g
pH	5,9

A cenoura triturada foi colocada em 500 mL de água destilada, durante 60 minutos e depois foi fervida durante 5 minutos. O caldo foi filtrado através de gaze, mediu-se o pH e acrescentou-se o ágar fundido previamente em 500 mL ao meio, sendo em seguida esterilizado em autoclave por 20 minutos.

4.2.2.4. Meio YPD:

Dextrose	20 g
Peptona	20 g
Água destilada	1000 mL
Extrato de levedura	10 g
Ágar	20 g
pH	5,9

A dextrose, a peptona, o extrato de levedura e o ágar foram fundidos em 500 mL de água destilada, usando um forno de microondas. Em seguida ajustou-se o volume com água destilada para 1000 mL. Esterilizou em autoclave a 120° C, durante 20 minutos.

4.2.3. Procedimento de isolamento e identificação

4.2.3.1. Isolamento dos microrganismos endofíticos

Para o isolamento dos microrganismos endofíticos foi utilizada a metodologia descrita por Petrini (1991), com algumas modificações. As coletas do material vegetal na Mata Atlântica foram realizadas em fevereiro de 2007, e as coletas no Campus A. C. Simões da UFAL em outubro de 2007.

Foram coletados caules e folhas, de alguns indivíduos que anteriormente foram identificados, no trabalho de Machado (2003), acondicionados em sacos plásticos, etiquetados e levados ao laboratório.

As folhas e os ramos provenientes do campo foram lavados em água corrente, sendo as extremidades dos pecíolos vedadas com parafina. A desinfecção superficial foi feita mergulhando-se sequencialmente o material em etanol (CH₃CH₂OH) a 70% por 10 segundos, solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 15 minutos, seguindo-se a lavagem por três vezes em águas destilada e esterilizada, sendo que 100µL da última água de lavagem foi inoculada nos meios de cultura, em placas de Petri, para verificação da eficiência da desinfecção.

A casca dos ramos, então, foi retirada e estes foram seccionados em partes menores. As folhas, por sua vez, foram seccionadas nas extremidades distal e proximal dos ramos. As secções de ramos e folhas foram dispostos em meio Ágar-água, em placas de Petri, e incubados a temperatura ambiente por 30 dias. As colônias fúngicas surgidas foram purificadas, utilizando-se os meios BDA, CA e YPD, sendo, em seguida, estocadas para posterior identificação e avaliação de suas relações com síntese de alcalóides indólicos e diterpenóides. O tempo de incubação foi de 30 dias.

4.2.3.2. Identificação dos microrganismos endofíticos

Para a identificação, efetuaram-se observações macroscópicas das características morfológicas das colônias. Posteriormente, microcultivos em BDA, a 28° C, conforme adaptação da metodologia de Kern e Blevins (1999). Assim, em uma placa de Petri foi adicionado um disco de papel toalha, um suporte de plástico sobre o qual foi colocada uma lâmina para microscopia, e em seguida, realizou-se a esterilização desse material em uma estufa a 170° C, por 60 minutos. Na câmara de fluxo, a placa foi aberta e depositou-se sobre a lâmina 300 µL de BDA, a fim de formar uma fina película. Após 48 horas, inoculou-se 20 µL da suspensão de células. A umidade foi mantida pela adição de água destilada esterilizada no disco de papel. A placa foi vedada com filme de PVC e mantida incubada por 24 horas, a 28° C. Posteriormente a lâmina foi coberta por uma lamínula esterilizada, e levada ao microscópio para observar esporos e hifas.

4.2.3.3. Identificação dos endofíticos através de técnicas moleculares

4.2.3.3.1. Extração de DNA

O protocolo de Saghai-Marroof 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). As fases foram separadas, transferindo-se a fase fenólica para outro tubo de 2 mL.

Foi acrescido 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. A solução foi homogeneizada até a visualização de um discreto aglomerado, sinalizando a presença de DNA. 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.

4.2.3.3.2. Amplificação do rDNA

Para realizar a análise da variabilidade em fungos, tem sido empregada a amplificação de fragmentos do rDNA, através da técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Utilizou-se nesta reação *primers* 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 4), esses genes são separados por regiões denominadas ITS. Nesse grupo os *primers* ITS1 e ITS2 amplificam a região ITS1 do rDNA, enquanto os primers 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'

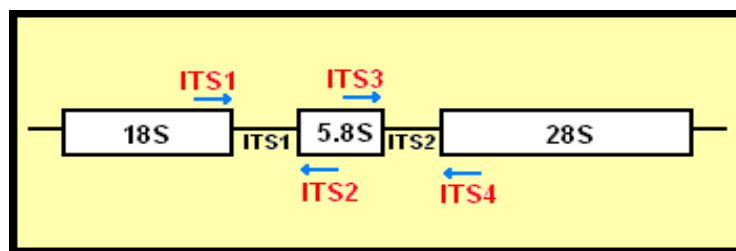


Figura 4. Modelo do cluster gênico que codifica para RNA ribossômico (Kamei, 2008).

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 *primers* 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 *primers*, 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 *primers* 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 μ L
Primer 1 (10 pmol/ μ L)	2,0 μ L
Primer 2 (10 pmol/ μ L)	2,0 μ L
Taq Polimerase (1U/0,2 μ L)	0,2 μ L*
DNA	1,0 μ L
H ₂ O Mili-Q	10,0 μ L
Volume final	25,00 μL

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

4.2.3.3.3. 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 ressuspenso em 20 μL de tampão TE.

O processo de purificação é um procedimento necessário para retirar o excesso de *primers* e dNTP's dos produtos de PCR. Esse excesso de *primers* 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).

4.2.3.3.4. Reação para seqüenciamento

Foi utilizado nesta reação o Kit BigDye™ 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
H ₂ O Milli-Q	4 µL
Volume final	10,00 µL

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

4.2.3.3.5. 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).

4.2.3.3.6. 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 porcentagem de similaridade genética entre uma sequência de nucleotídeos em estudo, com uma base de dados de sequências de nucleotídeos disponíveis no banco de genes do NCBI.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Isolamento de fungos endofíticos de pau-brasil

De todos os caules e folhas das plantas selecionadas aleatoriamente, surgiram colônias de endofíticos (Figura 5). Houve um predomínio de fungos filamentosos em relação a bactérias, tanto nos caules quanto nas folhas, o que está de acordo com o trabalho de Petrini et al. (1982), os quais observaram que, em plantas lenhosas, ocorre a transmissão horizontal de fungos através do ar, enquanto as bactérias são transmitidas verticalmente, ou seja, através das sementes.

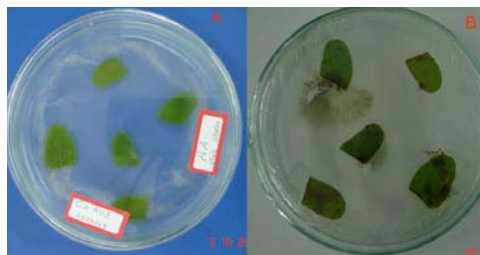


Figura 5. Folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. em meio ágar-água (A) e formação de colônias de endofíticos ao redor delas (B), surgindo após 19 dias de incubação.

Os fungos isolados foram repicados várias vezes até a obtenção de colônias puras, sendo posteriormente codificados, de acordo com a Tabela 4, e Figuras 6 e 7.

TABELA 4. Fungos endofíticos de caules e folhas de *Caesalpinia echinata* Lam., escolhidos aleatoriamente.

Código do fungo isolado	Significado do código
C.e.A6.F4.c.r.	Árvore 6 da mata; Fungo 4; do Caule; rosa (coloração)
C.e.A6.F4.c.b.	Árvore 6 da mata; Fungo 4; do Caule; branco (coloração)
C.e.A7.F3.c.	Árvore 7 da mata; Fungo 3; do Caule
C.e.A9.f.	Árvore 9 da mata; da Folha
C.e.AU2.F1.f.	Árvore da UFAL, em frente ao Inst. de Física; Fungo 1; da Folha
C.e.AU2.F2.f.	Árvore da UFAL, em frente ao Inst. de Física; Fungo 2; da Folha
C.e.AU2.F3.f.	Árvore da UFAL, em frente ao Inst. de Física; Fungo 3; da Folha
C.e.AU2.F4.f.	Árvore da UFAL, em frente ao Inst. de Física; Fungo 4; da Folha
C.e.AU2.F5.f.	Árvore da UFAL, em frente ao Inst. de Física; Fungo 5; da Folha
C.e.AU1.F1.f.	Árvore da UFAL, em frente à Reitoria; Fungo 1; da Folha

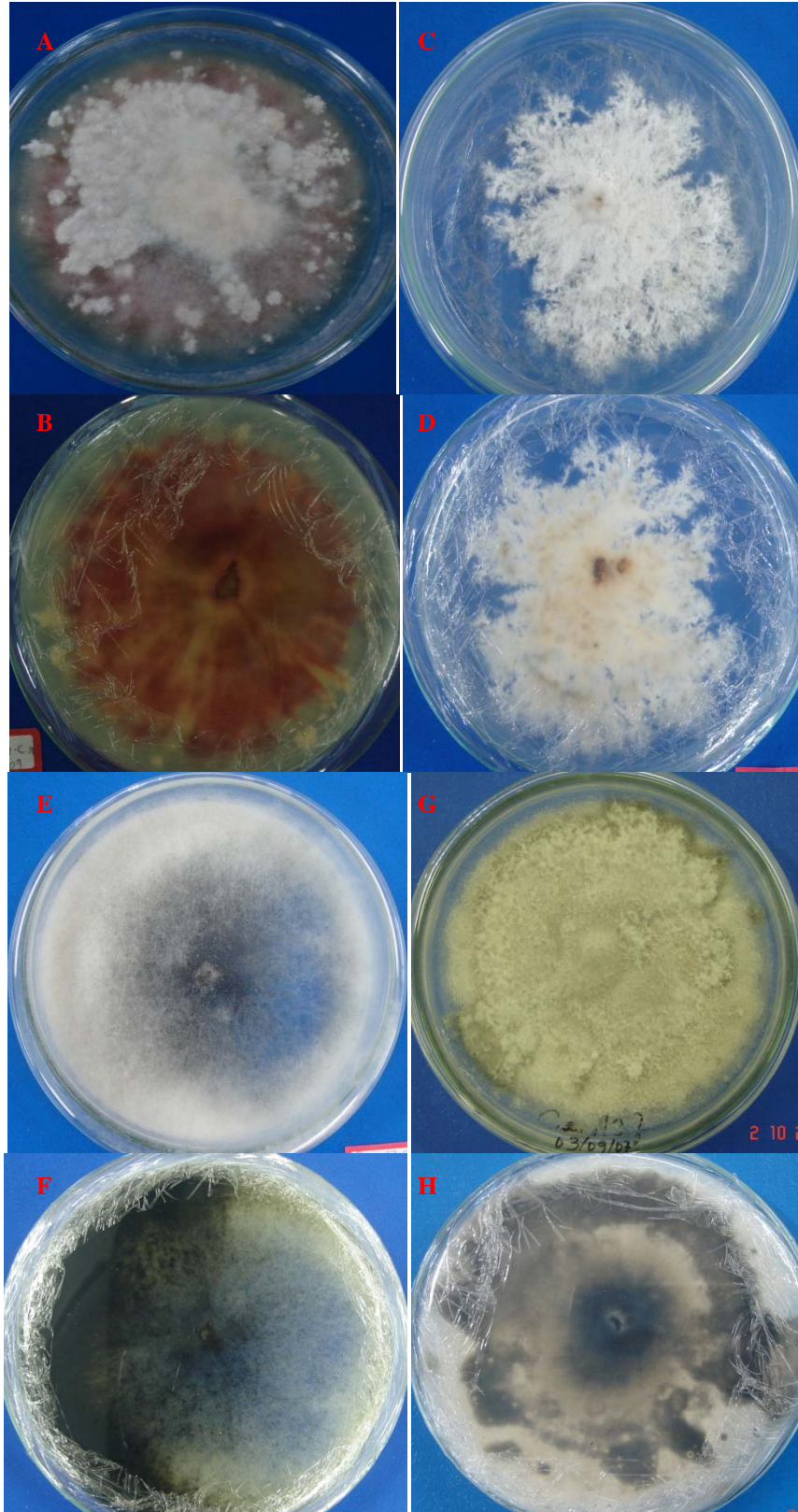


Figura 6. Aspecto geral das colônias isolados de *C. echinata*, de árvores da mata, C.e.A6.F4.c.r. (A e B), C.e.A6.F4.c.b. (C e D), C.e.A7.F3.c. (E e F) e C.e.A9.f. (G e H), (verso das culturas estão acima e reverso das mesmas estão abaixo), após 15 dias de crescimento em meio BDA a 28°C.

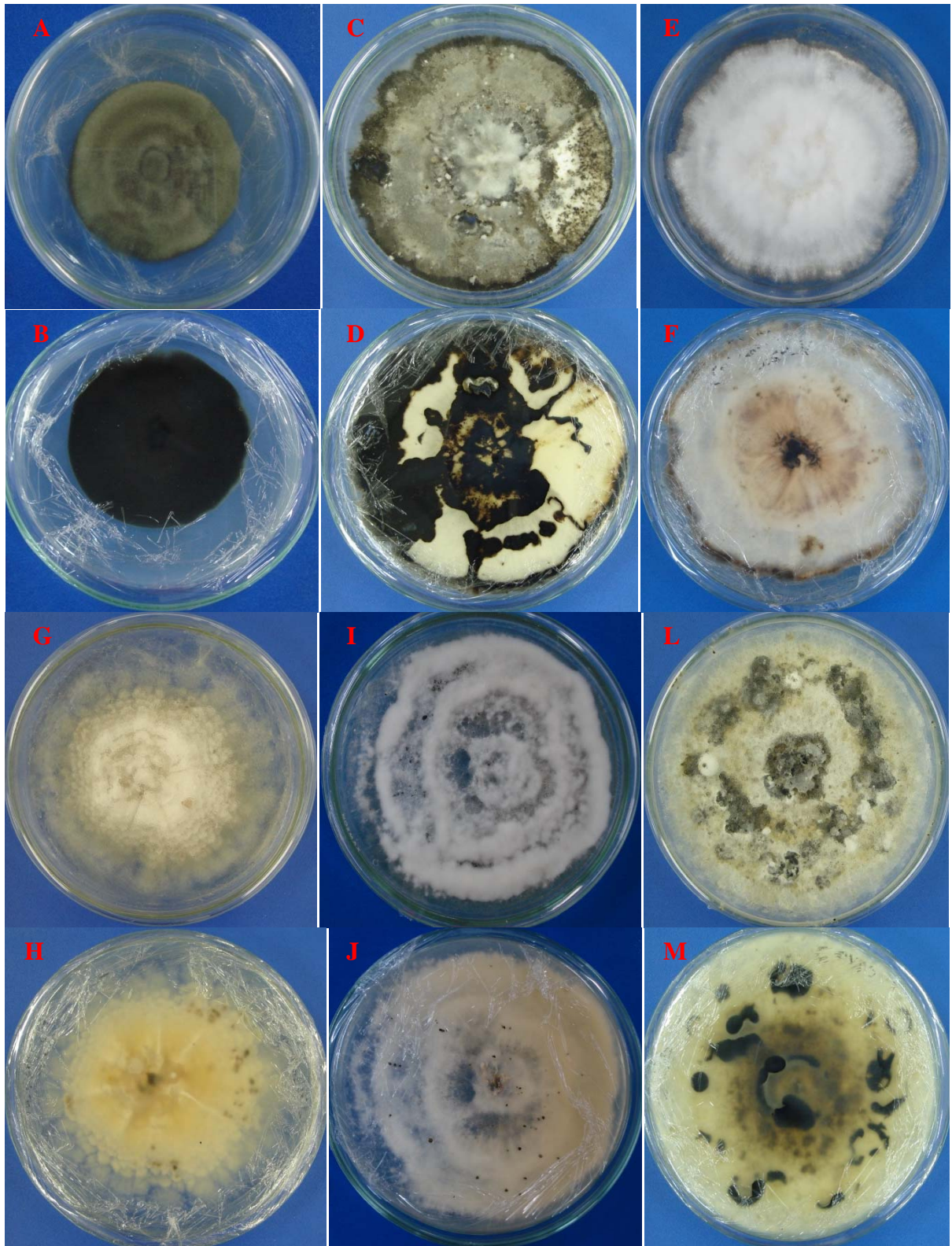


Figura 7. Aspecto geral das colônias isolados de *C. echinata*, de árvores da UFAL, C.e.AU2.F1.f. (A e B), C.e.AU2.F2.f. (C e D), C.e.AU2.F3.f. (E e F), C.e.AU2.F4.f. (G e H), C.e.AU2.F5.f. (I e J) e C.e.AU1.F1.f. (L e M), (verso das culturas estão acima e reverso das mesmas estão abaixo), após 15 dias de crescimento em meio BDA a 28°C.

Durante o processo de isolamento, as placas de Petri que continha inóculo da última água de lavagem do material vegetal não apresentaram crescimento de qualquer tipo de microrganismo, indicando que a esterilização foi eficiente na remoção dos epifíticos.

4.3.2. Caracterização morfológica e molecular de fungos endofíticos de pau-brasil

De acordo com as características morfológicas das colônias e as observações de microcultivo, através de microscopia óptica, foi possível sugerir a identificação de alguns endofíticos ao nível de gênero. Contudo, a identificação molecular dos endofíticos, com a colaboração do Laboratório de Genética – ICBS/UFAL, foi fundamental, pois os isolados não produziram estruturas de reprodução ao longo do cultivo, dificultando sua identificação em termos de espécie, como o isolado C.e.A7.F3.c. (Figura 8) que se destacou dos demais devido ao seu rápido crescimento.

A sequência consenso das regiões ITS1 e ITS2 do fungo endofítico C.e.A7.F3.c apresentou 516 nucleotídeos. Ao comparar esses nucleotídeos com o banco de dados do NCBI, esta mostrou ser 99% similar geneticamente com a do Ascomycota *Botryosphaeria rhodina* (Berk. et Curtis) Arx 1970 [anamorfo: *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon et Maubl. 1909], conforme Figura 9.

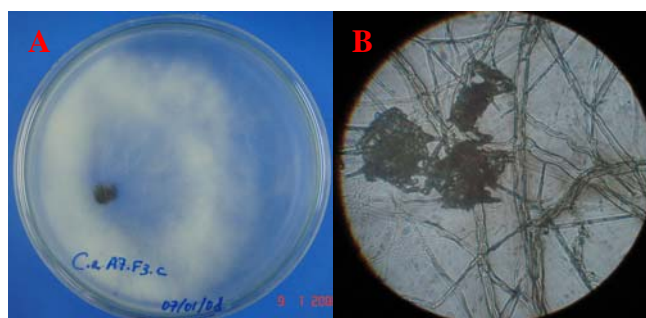


Figura 8 – Aspecto da colônia (A) e microcultivo (B), em um aumento de 1000 vezes, do fungo filamentosamente endofítico C.e.A7.F3.c., após dois dias de cultivo, em meio BDA a 28°C.

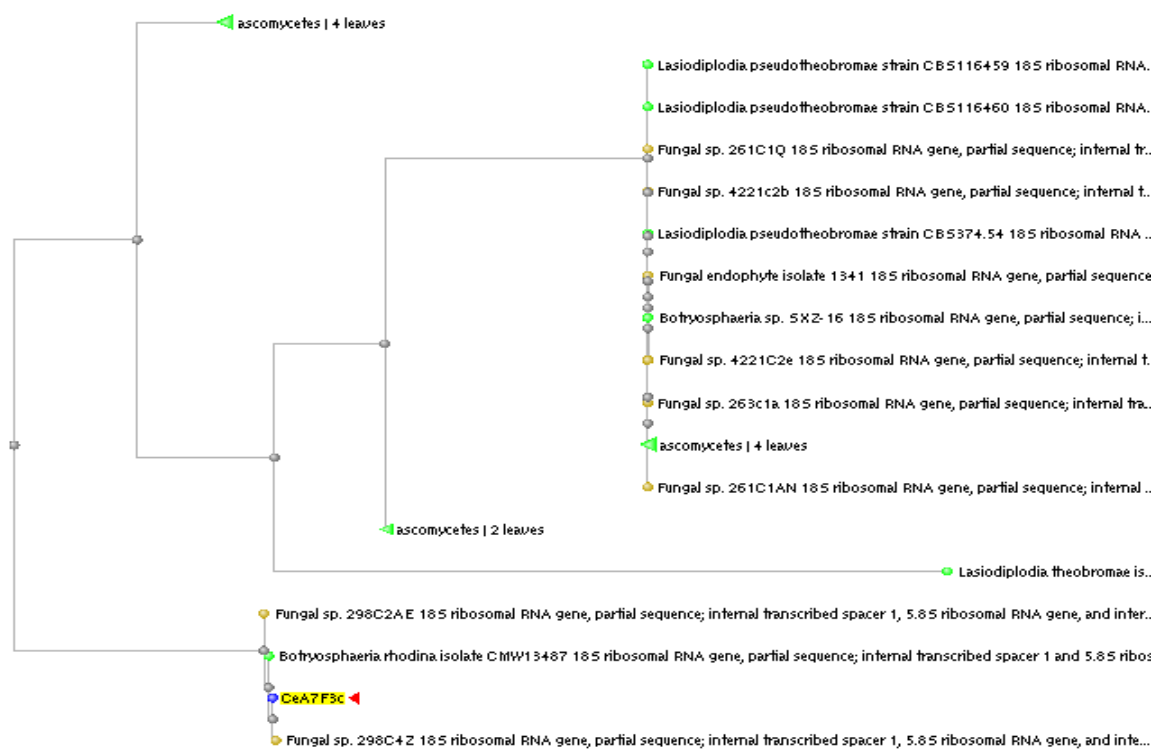


Figura 9. Identificação molecular com base na análise BLAST do NCBI, de *Botryosphaeria rhodina* (teleomórfica) e *Lasiodiplodia theobromae* (anamórfica), isolado de *C. echinata*.

Botryosphaeria rhodina pertence à ordem Dothideales, uma das principais ordens dos ascomicetos fitopatogênicos. Pode ser encontrado infectando tecidos de caule de plantas arbóreas, sendo comumente associado a cancras, quando essas árvores encontram-se em estresse fisiológico (Bergamin Filho et al., 1995).

O seu anamorfo *Lasiodiplodia theobromae* é conhecido como um patógeno de diversas culturas economicamente importantes. Há relatos em outros países associando o *L. theobromae* a lesões necróticas no caule de espécies de *Eucalyptus*. No Brasil, ocorre nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, principalmente em solos arenosos (Davison e Tay, 1983; Shearer et al., 1987). A seca dos ramos ou botriodiplodiose em videira (*Vitis* spp.) foi descrita em 1991, no município de Jales, em São Paulo (Ribeiro et al., 1992). Em pimenta-do-reino a murcha e queda das folhas foram associadas a *L. theobromae* (Radhakrishnan e Mammooty, 1979). Estudos desenvolvidos por Souza Filho et al. (1979), Warwick (1990) e Ram (1988) associam a queima das folhas do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) ao *L. theobromae*. Na literatura específica, *Botryosphaeria rhodina* está associado a doenças em diversas culturas de importância econômica, como a podridão seca da haste em graviola (*Annona muricata* L.) e em pinha (*Annona squamosa* L.) (Ponte, 1985); podridão dos frutos em bananeira (*Musa* spp.); podridão-carvão em cacau (*Theobroma cacao* L.); podridão do colo

e/ou das raízes em diversas cucurbitáceas, principalmente no melão (*Cucumis melo* L.); podridão por *Lasiodiplodia* em mamoeiro (*Carica papaya* L.); doenças secundárias em espigas de milho (Kimati et al., 1997); morte descendente em mangueira (*Mangifera indica* L.) (Tavares et al, 1991); resinose da cajarana (*Spondias dulcis* G. Forst.) e do cajá-imbu (*Spondias tuberosa* Arruda); seca-das-hastes do maracujá (*Passiflora edulis* Sims); seca-dos-ramos da roseira (*Rosa* spp.) (Ponte, 1996); podridão-seca-das-manivas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e da maniçoba (*Manihot glaziovii* Muell. Arg.) (Castro et al, 1977; Ponte et al, 1982). Freire et al. (2004) citam doenças causadas por esse fungo em: abacateiro (*Persea americana* Mill.), citros (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), eucalipto argentino (*Eucalyptus* sp.), jaqueira (*Arthocarpus integrifolia* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), ficus ornamental (*Ficus* sp.), figueira (*Ficus carica* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), meloeiro (*Cucumis melo* Blanco), mangueira (*Mangifera indica* L.), mamoeiro (*Carica papaya* L.), oiticica (*Licania rigida* Benth.), roseira (*Rosa* spp.), sapotizeiro (*Manilkara achras* (Mill.) Fosberg) e videira (*Vitis* sp.) como novos hospedeiros de *L. theobromae*, no Estado do Ceará. Ainda no Ceará, Viana et al. (2001) associaram ao *L. theobromae* à podridão-basal-pós-colheita do coco anão verde. Essa doença foi detectada em vários frutos que chegaram nos primeiros lotes exportados para a Espanha, causando perdas significativas.

No levantamento dos fungos associados a frutos e sementes de sapotizeiro (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen), Viana et al. (2003) verificaram que *L. theobromae*, comparado a outros fungos, ocorre com menor frequência, além disso pode ser removido da superfície dos frutos através de uma simples lavagem, e é considerado um oportunista por penetrar na polpa do fruto através de ferimentos.

Pereira et al. (2006) estudando oito isolados de *L. theobromae* verificaram que todos se comportaram como patogênicos ao serem inoculados em frutos sadios de caju, maracujá, manga, coco e mamão, apresentando seus sintomas entre 48 e 72 horas após terem sido inoculados, havendo uma variação quanto a agressividade dos mesmos aos seus hospedeiros.

No levantamento das doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas, comercializados na central de abastecimento de Recife, *L. theobromae* é um dos patógenos que ocorre com maior frequência, principalmente em laranja. (Dantas et al., 2003).

Entretanto, há estudos que correlacionam esse fungo como um endofítico. No estudo da diversidade e do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau, desenvolvido por Maki (2006), *Botryosphaeria rhodina* está presente, fazendo parte da comunidade endofítica e isolado principalmente de plantas de cacau resistentes. Dentre os fungos

endofíticos de cacau, isolados por Rubini et al. (2005) está presente o gênero *Botryosphaeria* e o anamorfo *L. theobromae*. Gong e Guo (2009) isolaram fungos endofíticos de duas plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa. Nesse estudo, *B. rhodina* foi isolado como endofítico associado às raízes da planta medicinal *Aquilaria sinensis* Merr.

Até o momento, este é o primeiro relato de *Botryosphaeria rhodina* como endofítico de *Caesalpinia echinata*.

O fungo codificado como C.e.AU2.F2.f, devido às características morfológicas da colônia (Figura 10), e o seqüenciamento genético, foi identificado com 95% de identidade com *Xylaria multiplex*.



Figura 10. Morfologia macroscópica do endofítico *Xylaria multiplex* isolado de *C. echinata*, em meio sólido (BDA), em meio líquido (BD) e micromorfologia (respectivamente), em microscópio óptico, em um aumento de 400 vezes, a 28°C.

O endofítico *Xylaria* sp. foi isolado das folhas de *C. echinata*, o que está de acordo com o estudo de Bayman et al. (1998) que sugerem que a transmissão desse fungo ocorre horizontalmente, sendo portanto, mais freqüente em folhas do que em sementes. De dezesseis gêneros isolados de dois mil e quatrocentos fragmentos de folhas, de *Musa acuminata*, coletados em três localidades diferentes, no Estado de São Paulo, *Xylaria* sp. foi o mais freqüente (Pereira et al., 1999). No estudo da variação de fungos endofíticos em raízes e em folhas de orquídeas do gênero *Lephanthes*, *Xylaria* foi um dos gêneros mais freqüentes, porém, a maior parte dos isolados foram provenientes das raízes (29%) e 19% foram isolados das folhas. Segundo os autores, essa diferença entre a freqüência de isolados das raízes e das folhas não foi significativa (Bayman et al., 1997).

Esse gênero é citado na literatura como endofítico freqüente em algumas plantas medicinais (Bussaban et al., 2001; Magalhães, 2001; Gamboa e Bayman, 2001; Naik et al., 2008) e também está associado a plantas tóxicas da Amazônia (Souza et al., 2004). Segundo Rubini et al. (2005), *Xylaria* sp. faz parte da comunidade endofítica de cacau. Cafêu et al. (2005) isolaram substâncias antimicrobianas a partir de *Xylaria* sp.

O endofítico codificado, por sua vez, como C.e.AU2.F5.f. (Figura 11), foi identificado através das características macroscópicas (coloração, bordas e tipo de micélio da colônia) e da micromorfologia dos conídios, como uma espécie do gênero *Pestalotiopsis*.

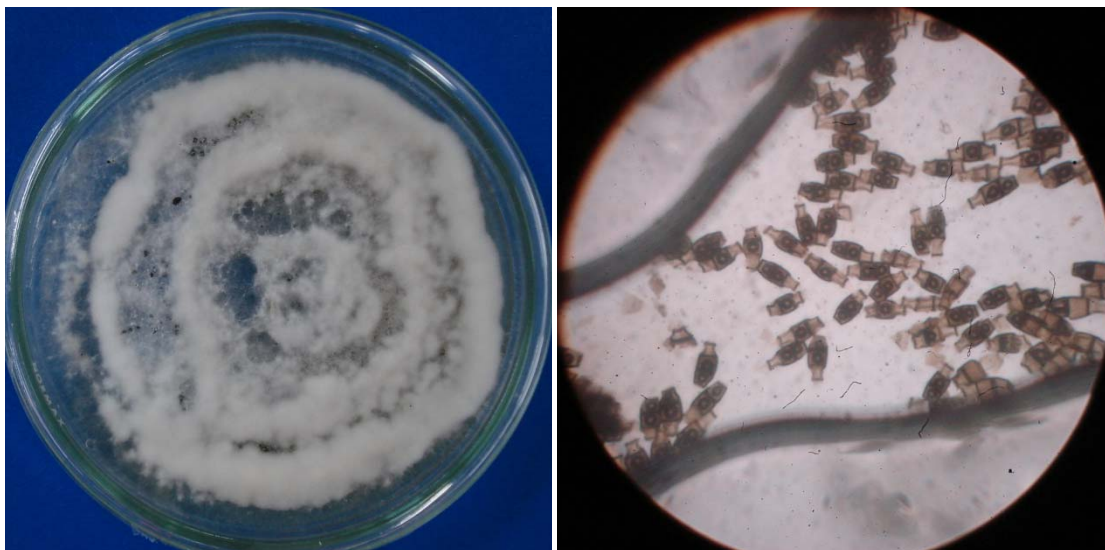


Figura 11. Macromorfologia e micromorfologia de conídios, de *Pestalotiopsis* sp. isolado de *C. echinata*, após 15 dias de crescimento, em meio BDA a 28°C., medindo cerca de 15 μ , num aumento de 1000 vezes,

Na cidade de Viçosa, em Minas Gerais, Mendes e Muchovej (1991) estudaram a causa das manchas necróticas em folhas de *C. echinata* que ocasionavam a queda prematura das folhas. Eles verificaram que a doença era causada pelo fungo *Pestalotiopsis maculans*. Esse mesmo gênero foi isolado a partir de folhas manchadas de *C. echinata* oriundas de um fragmento de Mata Atlântica, no município de Coruripe, em Alagoas, atuando como um fitopatógeno (Vieira, 2008). Entretanto, no presente estudo o gênero *Pestalotiopsis* sp. foi encontrado em folhas saudáveis de pau-brasil, ou seja, habitando-o assintomaticamente. No estudo de Rubini et al. (2005) *Pestalotiopsis* aparece dentre os endofíticos isolados do córtex de ramos de *Theobroma cacao*, na Bahia. Dentre os fungos endofíticos isolados de cacauzeiro e cupuaçuzeiro, por Hanada (2006), *Pestalotiopsis* está entre os de ocorrência mais comum.

Alguns endofíticos não puderam ser identificados, principalmente pelo fato de não produzirem estruturas reprodutivas nos cultivos obtidos.

4.4. Conclusões

- Foram isolados fungos endofíticos filamentosos, tanto do caule quanto das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.

- Através da identificação morfológica e molecular alguns endofíticos de *C. echinata* foram identificados, sendo eles: *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex* e *Pestalotiopsis* sp.

5. CAPÍTULO II: Antagonismo entre os fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* e fitopatógenos

5.1. Introdução

O número de pesquisas na área de biocontrole de patógenos é crescente no mundo inteiro, por ser uma alternativa viável em substituição ao controle de fitopatógenos através de produtos agroquímicos que têm causado tantos danos ao meio ambiente (Smith et al., 1990; Linhares et al., 1995; Martins-Corder e Melo, 1998; Moura e Romeiro, 1999; De Marco et al., 2000).

No controle biológico, pode haver a interação de um microrganismo com outros, onde esse microrganismo criará condições desfavoráveis ao desenvolvimento dos demais, sendo essa forma de interação denominada antagonismo (Bettiol, 1991). Os microrganismos antagonísticos podem ser selecionados *in vitro* ou *in vivo*, mas a maioria dos trabalhos relacionados a antagonismo dá preferência aos testes *in vitro*, e alguns, posteriormente, os testam *in vivo*, no campo, ou em casa de vegetação, neste sob um controle maior, uma vez que os microrganismos podem ser dispersos pelo vento e causar danos em diversas cultivares (Mariano, 1993). Os métodos de seleção *in vitro* podem ser qualitativos ou quantitativos. Quando o objetivo do estudo é selecionar biocontroladores os métodos quantitativos são os mais utilizados.

O método da cultura pareada está entre os mais freqüentes nos trabalhos com antagonismo (Martins-Corder; Melo, 1998; Ethur et al., 2001; Gomes et al., 2001; Amorim; Melo, 2002; Moreira et al., 2002; Kupper et al., 2003; Ribini et al., 2005; Maki, 2006; Lisboa et al., 2007; Martins et al., 2007). Esse método tanto pode ser feito com ágar em placa, ou em lâmina. Segundo Andrews (1992), o método do ágar em lâmina é considerado uma versão microscópica do método do ágar em placa, apresentando vantagem sobre o primeiro, uma vez que possibilita a visualização da interação entre as hifas dos antagonísticos. Nesse método também pode ser observada a inibição da produção de esporos de um fungo causada pelo antagonístico. Enquanto na placa só será possível a visualização de outros tipos de interação, como a sobreposição de micélio, a antibiose caracterizada por halo de inibição e a lise da colônia, entre outras.

Dentro de uma planta hospedeira, os endofíticos mantêm relações antagonísticas com os fitopatógenos, tais como: antibiose, indução de resistência, micoparasitismo e uma constante

disputa por espaço e por alimento fornecido pela planta hospedeira (Johnson; Whitney, 1992). Muitos endofíticos inibem o crescimento e até mesmo causam a morte desses patógenos, 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 et al., 2002; Cúndom et al., 2003; Montealegre et al., 2005; Remuska; Pria, 2007; Martins et al., 2007; Lisboa et al., 2007; Silva et al., 2008). Algumas bactérias também têm sido utilizadas no controle de patógenos, sendo que diversos trabalhos destacam o grande potencial de espécies do gênero *Bacillus* (Gomes et al., 2001; Amorim; Melo, 2002; Kupper et al., 2003; Remuska; Pria, 2007). Mas, ainda há uma infinidade de microrganismos que ainda não foram testados quanto à sua capacidade antagonica frente a fitopatógenos que causam prejuízos substanciais à agricultura.

Dentre os fungos mais freqüentes que podem causar podridões de raízes está o *Pythium debarianum* Hesse. Este é caracterizado por apresentar um micélio fino, de cor branca e com aspecto cotonoso. A fase sexuada do *Pythium* caracteriza-se pela formação de oósporos que também atuam como estrutura de resistência (Kimati et al., 1997). Outro membro desse grupo de grande importância econômica é o gênero *Phytophthora* (que significa “destruidor de planta”) que possui cerca de trinta e cinco espécies, sendo um patógeno importante por causar destruição em muitas culturas (Raven et al., 2007). São várias as doenças causadas por *Phytophthora palmivora*: podridão das raízes em anonáceas; podridão parda em citros (*Citrus* spp.) e no cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.); podridão do olho em coqueiros (*Cocos nucifera* L.); gomose em mamoeiro (*Carica papaya* L.); cancro, requeima e queda anormal das folhas em seringueira (*Hevea brasiliensis* M. Arg.), entre outras (Kimati et al., 1997).

Alguns fungos patogênicos podem colonizar uma planta de forma epifítica e depois tornar-se patogênicos. A exemplo de algumas espécies de ascomicetos do gênero *Phomopsis*, responsáveis por doenças em sementes de soja que têm sido detectados epifiticamente em plantas assintomáticas (Esposito; Azevedo, 2004). Esse gênero está associado a diversas doenças, dentre elas a seca dos ramos em plantas ornamentais e desfolhamento em frutíferas da Amazônia (Kimati et al., 1997).

O “Damping-off” ou Tombamento-das-sementeiras de diversas cultivares, como: cafeeiro (*Coffea arábica* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), citros (*Citrus* spp.), coentro

(*Coriandrum sativum* L.) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) está associado ao fungo deuteromiceto *Rhizoctonia solani* Kühn (Ponte, 1996). Kimati et al. (1997) cita outras culturas vulneráveis a essa doença, dentre elas: algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), alho (*Allium sativum* L.), cebola (*Allium cepa* L.), abacateiro (*Persea americana* Mill.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. é o agente etiológico da antracnose. Na fase anamórfica o fungo produz conídios que germinam ao entrar em contato com a superfície do hospedeiro, produzindo apressórios que possibilitam a fixação e a penetração em qualquer órgão da planta. O fungo ataca as folhas, galhos e frutos de diversas frutíferas, como exemplos: goiabeira (*Psidium guajava* L.), pinha (*Annona squamosa* L.), graviola (*Annona muricata* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e abacateiro (Kimati et al., 1997). Freire e Barguil (2009) descreveram a primeira ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de carnaubeira (*Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore) no Brasil.

A “pestalotiose”, doença causada pelo fungo *Pestalotiopsis*, é de ocorrência comum em cajueiros e geralmente encontra-se associada à antracnose (Kimati et al., 1997). Outra doença causada por esse gênero é a Mancha de *Pestalotiopsis* que tem causado enfermidades em *Heliconia* sp. (Serra; Coelho, 2007), morangueiro (*Fragaria vesca* L.) (Dias et al., 2007) e coqueiro (Cardoso et al., 2003).

A fim de estudar o potencial antagonista dos endofíticos *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., C.e.A6.F4.c.r., C.e.A6.F4.c.b., C.e.A9.f., C.e.AU2.F1.f., C.e.AU2.F3.f., C.e.AU2.F4.f. e C.e.AU1.F1.f., isolados de *Caesalpinia echinata* Lam., frente aos patógenos *Pythium debaryanum*, *Phytophthora palmivora*, *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Pestalotiopsis* sp., foram feitos testes *in vitro* utilizando os métodos de ágar em placa de Petri e ágar em lâmina.

5.2. Material e métodos

O trabalho foi realizado no “Laboratório de Biotecnologia de Plantas e de Microrganismos Endofíticos”, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas.

5.2.1. Obtenção dos fungos endofíticos e dos fitopatógenos

Foram utilizados microrganismos endofíticos isolados de árvores da espécie *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), identificada no estudo de Machado (2003), encontradas em uma área de Mata Atlântica, no município de Coruripe, no sul do Estado de Alagoas (Latitude 10°2'37'' e Longitude 36°16'20'') e no Campus A. C. Simões (Latitude 9°28'42'' e Longitude 35°34'55''), da Universidade Federal de Alagoas.

Todos os fitopatógenos utilizados, listados na Tabela 5 e ilustrados na Figura 12, foram oriundos de trabalhos anteriores, desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas e de Microrganismos Endofíticos, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas.

TABELA 5. Listagem referência de fungos fitopatógenos utilizados nos testes de atividade antifúngica e suas características de patogenicidade. Todos foram incubados em meio BDA, em pH 6,8, a temperatura de 28° C.

Patógenos	Doença causada
<i>Pythium debaryanum</i> Hesse	Pé negro
<i>Phytophthora palmivora</i> Butler	Gomose
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Mancha de <i>Pestalotiopsis</i>
<i>Phomopsis</i> sp.	Escoriose
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	Podridão-de-rhizoctonia
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz	Antracnose foliar

Apesar de todos os fungos utilizados serem conhecidos como importantes fitopatógenos, alguns deles foram isolados como endofíticos de algumas plantas. O fungo endofítico *Phomopsis* sp. foi isolado a partir das folhas saudáveis da planta *Turnera subulata* Sm. (Santos, 2009). Das sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi, foi isolado o endofítico *Rhizoctonia solani* (Albuquerque, 2007). O endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* foi isolado a partir de folhas de *Mirabilis jalapa* Linn. (Morilla, 2009).

Como patogênicos foram isolados *Pythium debaryanum* e *Phytophthora palmivora* de lesões em folhas de mamoeiro, e *Pestalotiopsis* sp. foi isolado a partir de folhas manchadas e necrosadas de *Caesalpinia echinata* Lam. (Vieira, 2008).

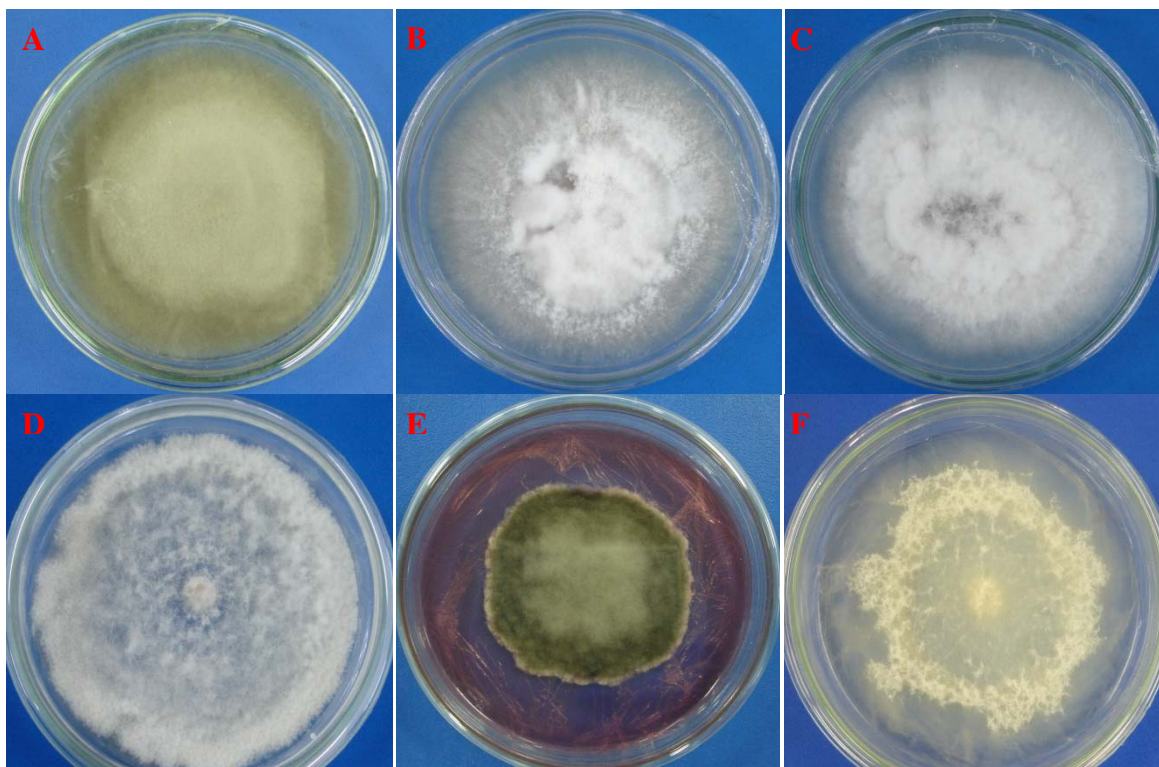


Figura 12. Aspecto geral da colônias dos fungos utilizados nos testes de antagonismo: *Pythium debaryanum* (A), *Phytophthora palmivora* (B), *Pestalotiopsis* sp. (C), *Phomopsis* sp. (D), *Rhizoctonia solani* (E) e *Colletotrichum gloeosporioides* (F), após 15 dias de cultivo, em meio BDA.

5.2.2. Meios de cultura

5.2.2.1. Batata, Dextrose e Ágar (BDA) (Riker & Riker, 1936):

Discos de batata inglesa descascada	200 g
Dextrose	20 g
Água destilada	1000 mL
Ágar	17 g
pH	6,8

Os discos de batata foram fervidos em 500 mL de água destilada por 30 minutos. Após filtração através de gaze, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 mol.L⁻¹ antes de adicionar o ágar. Em seguida foi feita a esterilização em autoclave.

5.2.2.2. Meio Cenoura (CA) (Tuite, 1969):

Cenoura triturada	20 g
Ágar	17 g
pH	5,9

A cenoura triturada foi colocada em 500 mL de água destilada, durante 60 minutos e depois foi fervida durante 5 minutos. O caldo foi filtrado através de gaze, mediu-se o pH e acrescentou-se o ágar fundido previamente em 500 mL ao meio, sendo em seguida esterilizado em autoclave por 20 minutos.

5.2.2.3. Batata, Cenoura e Ágar (BCA) (Tuite, 1969):

Discos de batata descascada	20 g
Discos de cenoura descascada	20 g
Água destilada	1000 mL
Ágar	17 g
pH	6,8

Os discos de batata e cenoura foram colocados em 500 mL de água destilada, por 60 minutos e em seguida fervidos por 5 minutos. Após filtração através de gaze, o ágar foi fundido em 500 mL de água destilada e misturado ao caldo resultante, ajustando-se o volume com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 mol.L⁻¹ antes de adicionar o ágar. A solução foi esterilizada em autoclave.

5.2.3. Atividade antifúngica em meio sólido

O antagonismo dos endofíticos de pau-brasil foi ensaiado pelo método da cultura pareada, ou simplesmente pareamento, que constou no confronto direto do endofítico isolado de pau-brasil contra o fungo patogênico, em placas de Petri com meio de cultura sólido (Mariano, 1993). Foram utilizados três meios, BDA (batata-dextrose-ágar), BCA (batata-cenoura-ágar) e CA (cenoura-ágar), observando-se em qual deles haveria um melhor crescimento micelial dos fungos.

Utilizando um vazador de rolhas, foram retirados cilindros de 6 mm de diâmetro do micélio dos fungos endofíticos, das bordas das colônias em crescimento, em meio BDA, incubados a temperatura de 28° C. Procedeu-se igualmente com os fungos fitopatogênicos. Estes foram transferidos para placas de Petri contendo BDA, BCA e CA, tendo sido os cilindros colocados em pólos opostos, a uma distância de 1 cm da borda da placa. O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições, no esquema fatorial 10 x 6 (antagonistas: *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex*, *Pestalotiopsis* sp., C.e.A6.F4.c.r., C.e.A6.F4.c.b., C.e.A9.f., C.e.AU2.F1.f., C.e.AU2.F3.f., C.e.AU2.F4.f. e C.e.AU1.F1.f.; e fitopatógenos: *Pythium debaryanum*, *Phytophthora palmivora*, *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Pestalotiopsis* sp.). Foram utilizadas como controles placas de Petri contendo BDA, BCA e CA com cilindros somente do endófito e apenas do patógeno, em posições equivalentes às das testemunhas. Após 24 horas de incubação, os fungos endofíticos desenvolvidos em placas de Petri nos meios BDA, BCA e CA, pH 6,8 a 28° C, investigou-se a presença de halo de inibição do crescimento micelial do fungo patogênico em relação ao endófito.

Os microrganismos identificados como potenciais antagonistas foram utilizados no método do ágar em lâmina. Previamente, foi feita a esterilização de todo o material a ser utilizado no antagonismo. Dentro das placas de Petri, as lâminas ficaram suspensas acima do disco de papel toalha, utilizando suportes feitos por canudos, resistentes à temperatura de esterilização (120° C a 1 atm). Sob a lâmina, foi feita uma película fina com 300 µL BDA. Posteriormente, foram inoculados 20 µL da suspensão dos esporos fúngicos tanto do endofítico quanto do fitopatógeno, um ao lado do outro, sobre a película de BDA na lâmina. A umidade foi mantida pela adição de água destilada esterilizada no disco de papel. A placa foi vedada com filme de PVC. Após 24 horas, as lâminas foram levadas ao microscópio para observar o comportamento das hifas do endofítico em relação às dos patógenos e a produção de esporos. Alguns endofíticos sobrepuseram os fitopatógenos, impedindo o reconhecimento da interação entre as hifas, sendo necessário repetir o antagonismo e observar as lâminas em intervalos de tempo bem menores.

A porcentagem de inibição do crescimento, no método da cultura pareada em placa de Petri, foi determinada através da medida do diâmetro das colônias do fitopatógeno, em vários dias de crescimento, subtraindo-se o diâmetro do inóculo original. Esses cálculos foram feitos de acordo com Edginton et al. (1971), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição (PI\%)} = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

Na qual, **Dc** corresponde ao diâmetro médio da colônia do fitopatógeno no controle e **Dt** é o diâmetro médio da colônia do patógeno nos tratamentos testados.

5.2.4. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste de ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$), utilizando o *software* Origin™ 8.0.

5.3. Resultados e discussão

Dos meios utilizados, o BDA proporcionou um melhor crescimento micelial, tanto dos endofíticos isolados quanto dos fitopatógenos testados, quando comparado ao crescimento em meio BCA e CA. Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira et al. (2006) que utilizou diferentes meios de cultura para avaliar o crescimento micelial de isolados de *Lasiodiplodia theobromae*, no qual o BDA promoveu um bom desempenho na taxa de crescimento micelial, destacando-se do meio CA. Em geral, o crescimento micelial foi menor no meio CA. Nos meios BCA e CA, as colônias apresentaram clareamento de seus micélios.

Nos testes de antagonismo, alguns microrganismos endofíticos não inibiram o crescimento dos fitopatógenos, mas três deles *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex* e *Pestalotiopsis* sp., apresentaram forte inibição frente a todos os fitopatógenos. Sendo as interações classificadas em três tipos: 1) Inibição do crescimento do fitopatógeno, com sobreposição de hifas; 2) Inibição do crescimento do fitopatógeno, sem sobreposição de hifas e 3) Ausência de inibição de crescimento.

Dos endofíticos de *C. echinata* testados, 70% promoveram a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Pythium debaryanum* (Tabela 6). Este fungo está relacionado a doenças em várias culturas, causando principalmente o tombamento de mudas e a podridão das raízes (Ponte, 1996). *Botryosphaeria rhodina* apresentou a maior porcentagem de inibição no crescimento micelial de *P. debaryanum* (53,4%), seguido de *Pestalotiopsis* sp. (51,1%), *Xylaria multiplex* (48,8%), C.e.AU1.F1.f (33,9%), C.e.AU2.F4.f (31,0%) e C.e.AU2.F3.f

(21,8%). O fungo codificado como C.e.A9.f foi quem promoveu a menor porcentagem de inibição do fitopatógeno (2,3%).

TABELA 6. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de *C. echinata* (pau-brasil) e o fitopatógeno *Pythium debaryanum*.

Isolados	Tipo de interação	Inibição (%)
C.e.A6.F4.c.r.	3	0
C.e.A6.F4.c.b.	3	0
C.e.A9.f.	3	2,3
<i>Xylaria multiplex</i>	1	48,8
C.e.AU2.F1.f.	3	0
<i>B. rhodina</i>	1	53,4
C.e.AU2.F3.f.	2	21,8
C.e.AU2.F4.f.	2	31,0
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2	51,1
C.e.AU1.F1.f.	2	33,9

O endofítico *Botryosphaeria rhodina* não apenas inibiu significativamente o crescimento do *Pythium debaryanum*, como também o sobrepôs em apenas dois dias de incubação (Figura 13) e ao final de três dias toda a placa foi tomada. Apesar de *Pestalotiopsis* sp. ter inibido o crescimento do *P. debaryanum*, não houve sobreposição das hifas (Figura 14). *Xylaria multiplex* também apresentou uma interação do tipo 1, ou seja, sobrepôs o *P. debaryanum*, e ainda promoveu uma descoloração da colônia (Figura 15). As interações do tipo 1, nas quais há a sobreposição do endofítico sobre o fitopatógeno, sugere a existência de parasitismo. No confronto direto dos endofíticos de *C. echinata* com o fitopatógeno *Pythium debaryanum* podem ter ocorrido, as ações antagônicas de parasitismo e, competição por espaço e nutrientes. Os endofíticos *Botryosphaeria rhodina*, *Pestalotiopsis* sp. e *Xylaria multiplex*. foram mais eficazes em controlar o *Pythium debaryanum*, não apresentando diferença significativa entre esses isolados, na redução do crescimento micelial do fitopatógeno (Figura 16). Também não houve diferença significativa, na redução do crescimento micelial promovida pelos isolados dos endofíticos C.e.AU1.F1.f, C.e.AU2.F4.f e C.e.AU2.F3.f. O endofítico C.e.A9.f inibiu o crescimento de *P. debaryanum*, porém a redução não foi significativa ao nível de 5%, de acordo com o teste de Tukey.

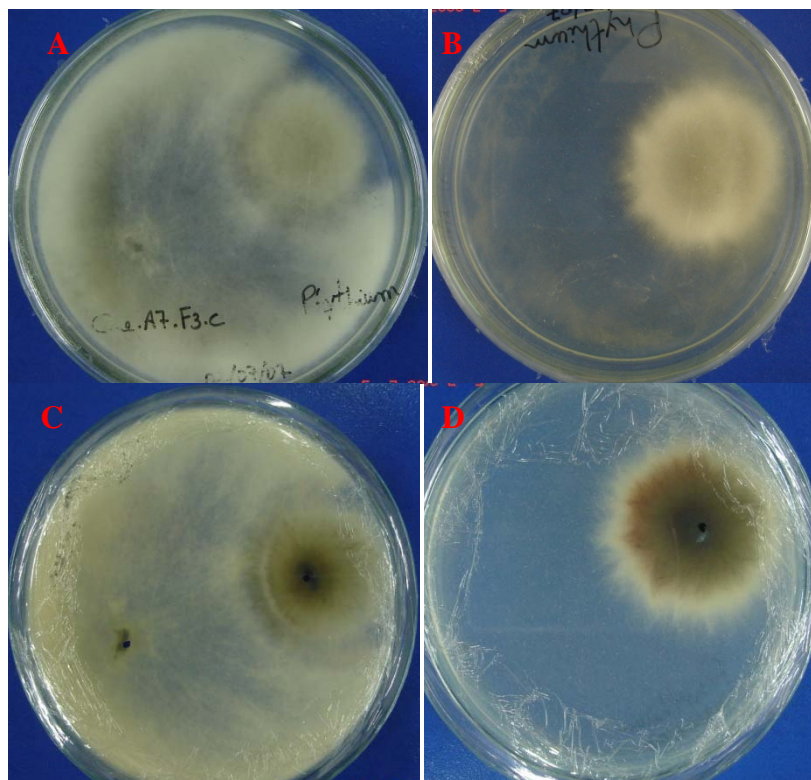


Figura 13. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Pythium debaryanum* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 3 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. debaryanum*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

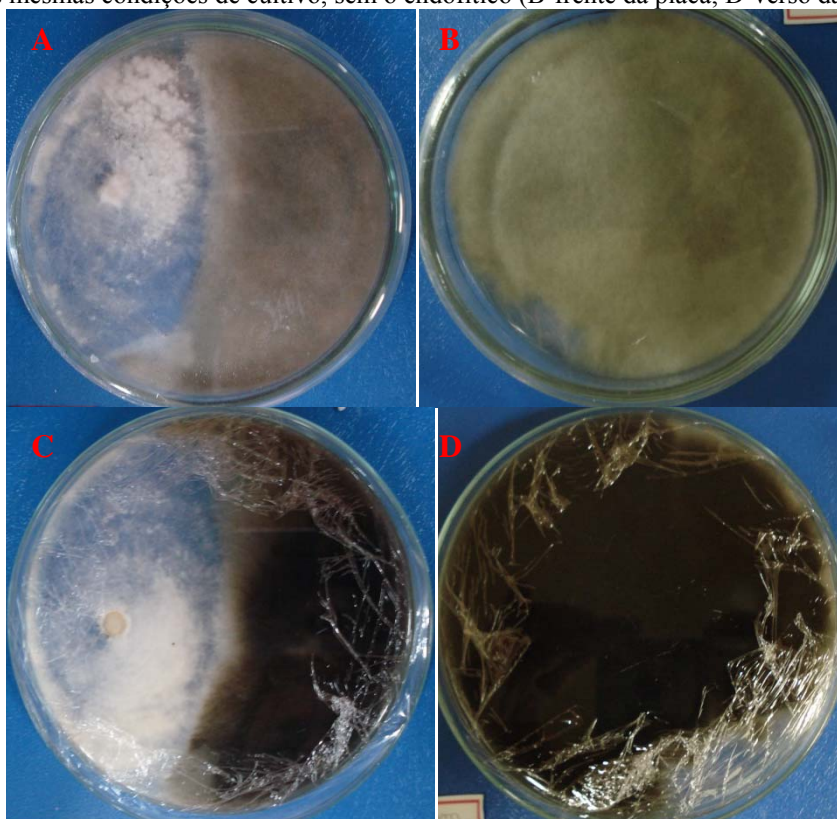


Figura 14. Antagonismo de *Pestalotiopsis* sp. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Pythium debaryanum* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. debaryanum*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

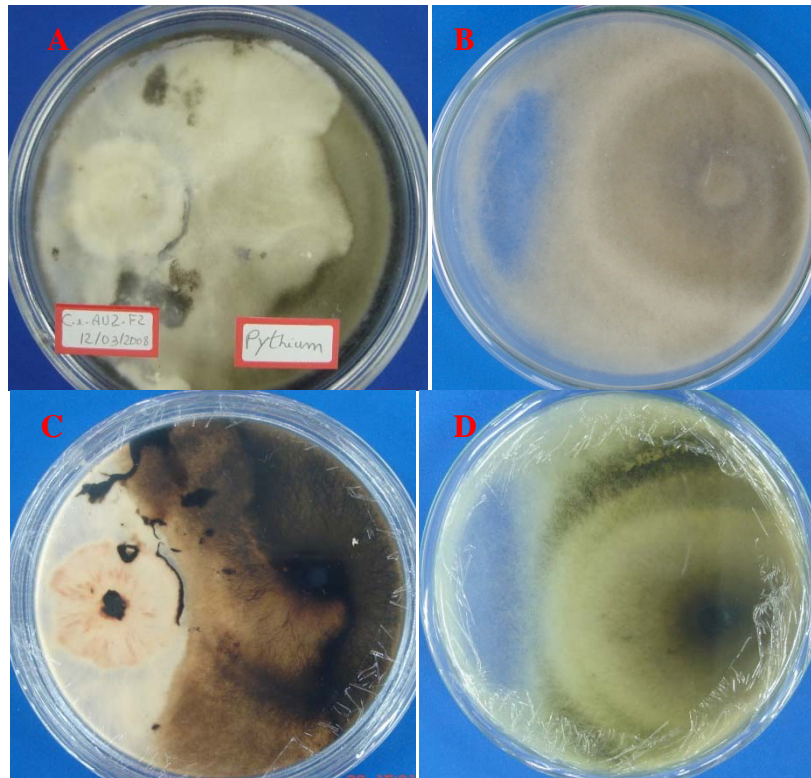


Figura 15. Antagonismo de *Xylaria multiplex* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Pythium debaryanum* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. debaryanum*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

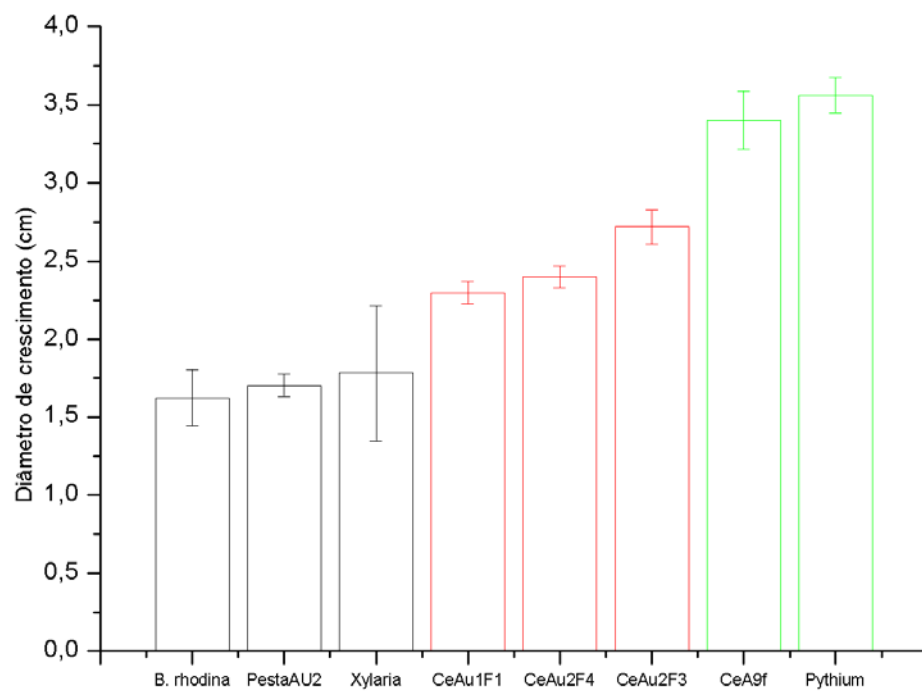


Figura 16. Redução do crescimento de *Pythium debaryanum* causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

No antagonismo frente ao *Phytophthora palmivora*, cinco dos endofíticos de *C. echinata* reduziram o crescimento micelial do fitopatógeno (Tabela 7).

TABELA 7. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de *C. echinata* (pau-brasil) e o fitopatógeno *Phytophthora palmivora*.

Isolados	Tipo de interação	Inibição (%)
C.e.A6.F4.c.r.	3	0
C.e.A6.F4.c.b.	3	0
C.e.A9.f.	3	15
<i>Xylaria multiplex</i>	1	69
C.e.AU2.F1.f.	3	0
<i>B. rhodina</i>	1	60
C.e.AU2.F3.f.	3	0
C.e.AU2.F4.f.	2	75
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2	55
C.e.AU1.F1.f.	3	0

O endofítico C.e.AU2.F4.f. foi responsável pela maior redução do crescimento micelial do fitopatógeno, reduzindo o seu crescimento micelial em 75%. Mas, apesar de uma redução tão significativa, C.e.AU2.F4.f. não sobrepôs o patógeno (Figura 17). *Xylaria multiplex* inibiu o crescimento de *P. palmivora* em 69,0%, sobrepondo o fitopatógeno após quinze dias de cultivo (Figura 18). *Botryosphaeria rhodina* também apresentou uma interação do tipo 1, tomando toda a placa em três dias (Figura 19). A rápida colonização do substrato por *B. rhodina* demonstra o comportamento agressivo e a capacidade de competição desse fungo. Ao vencer a competição por espaço e nutriente, apresentando a interação do tipo 1, esses endofíticos estão exercendo uma forma de biocontrole do fitopatógeno. *Pestalotiopsis* sp. inibiu em 55% o crescimento do fitopatógeno, mas não o sobrepôs (Figura 20).

Na verificação da inibição do crescimento de *Phytophthora palmivora* não houve diferença significativa entre os endofíticos C.e.AU2.F4.f., *Xylaria multiplex* e *Botryosphaeria rhodina* (Figura 21). Houve diferença significativa entre os demais isolados. E a redução do crescimento micelial promovida pelo endofítico denominado C.e.A9.f. não foi significativa a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey.

No estudo desenvolvido por Amorim e Melo (2002) os isolados bacterianos foram os mais ativos inibidores do crescimento micelial de duas espécies de *Phytophthora*, porém apresentaram percentuais de inibição inferiores aos demonstrados pelos quatro endofíticos de *C. echinata*.

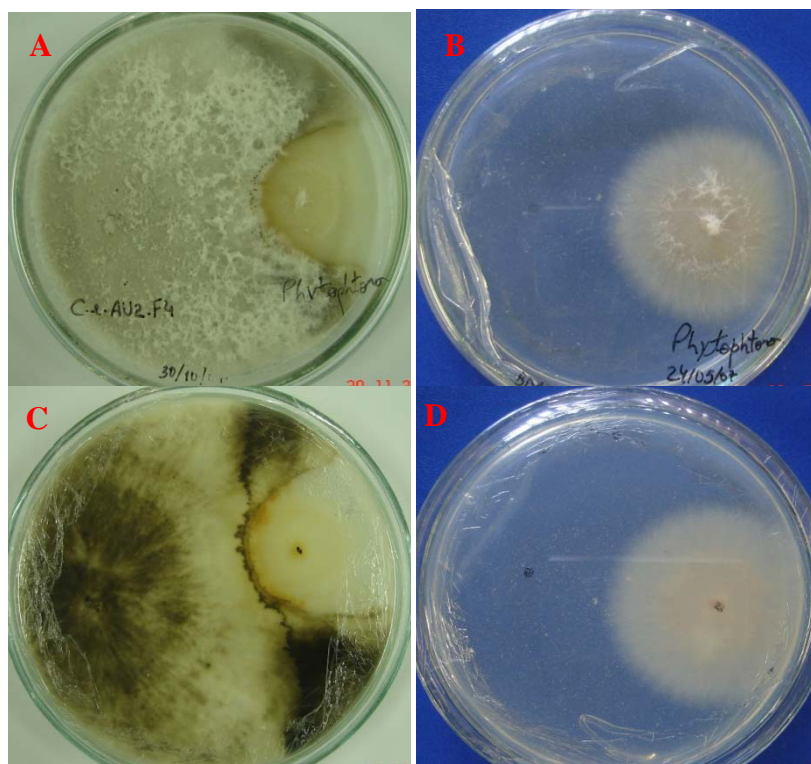


Figura 17. Antagonismo de C.e.AU2.F4.f. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phytophthora palmivora* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. palmivora*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

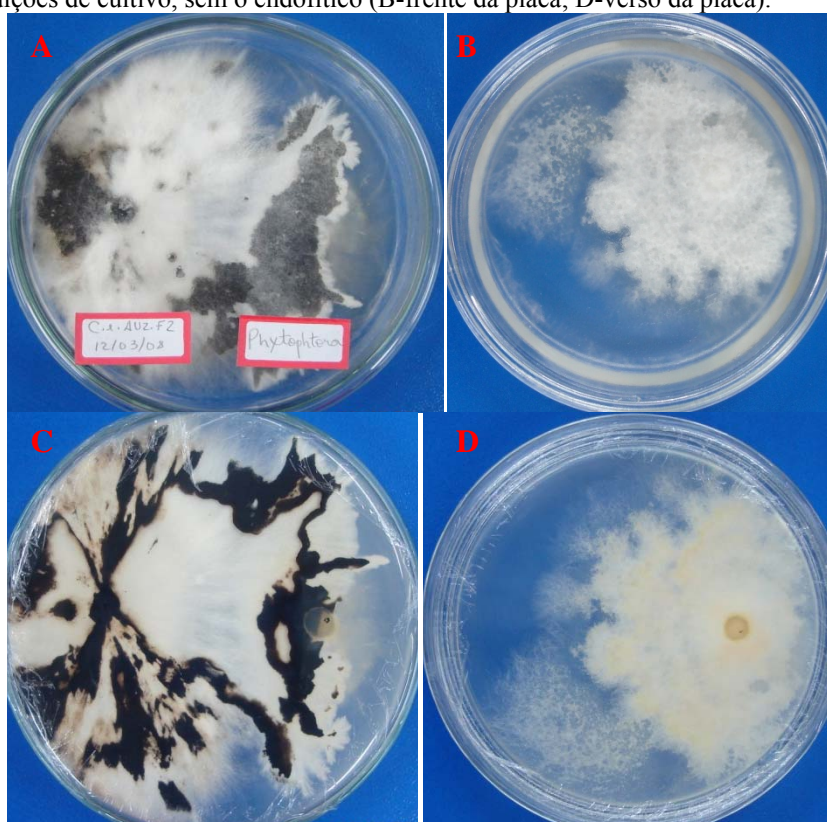


Figura 18. Antagonismo de *Xylaria multiplex* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phytophthora palmivora* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. palmivora*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

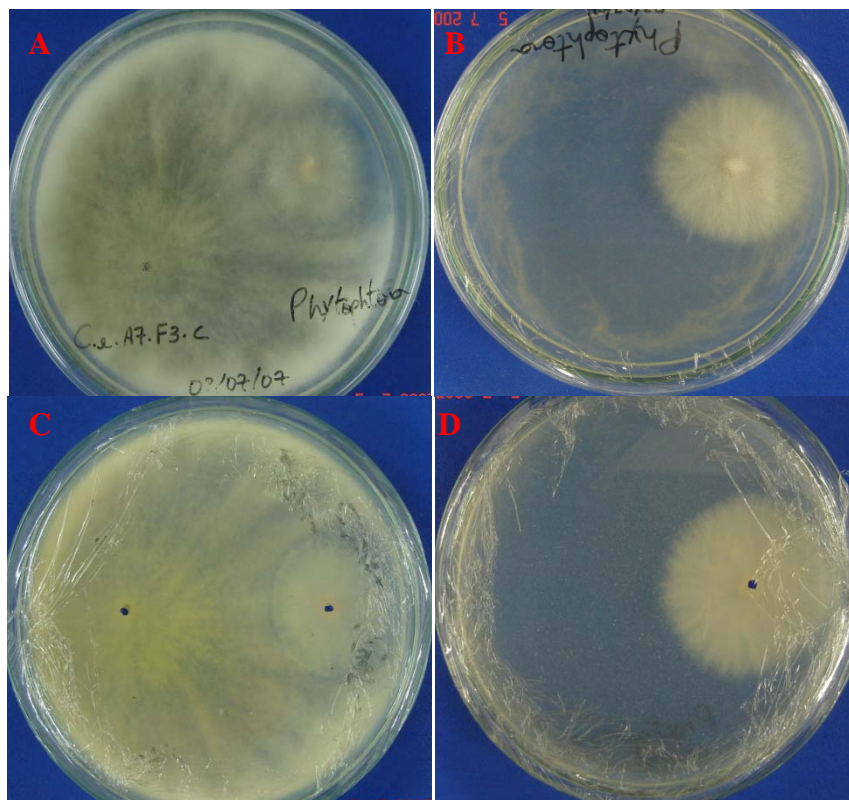


Figura 19. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phytophthora palmivora* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. palmivora*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

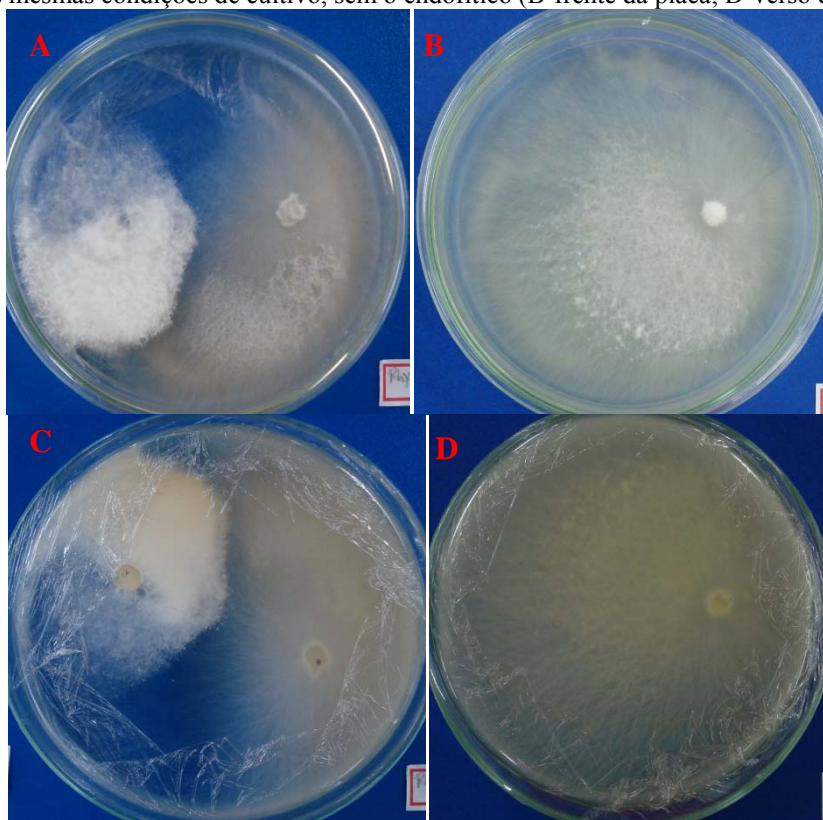


Figura 20. Antagonismo de *Pestalotiopsis* sp. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phytophthora palmivora* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *P. palmivora*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

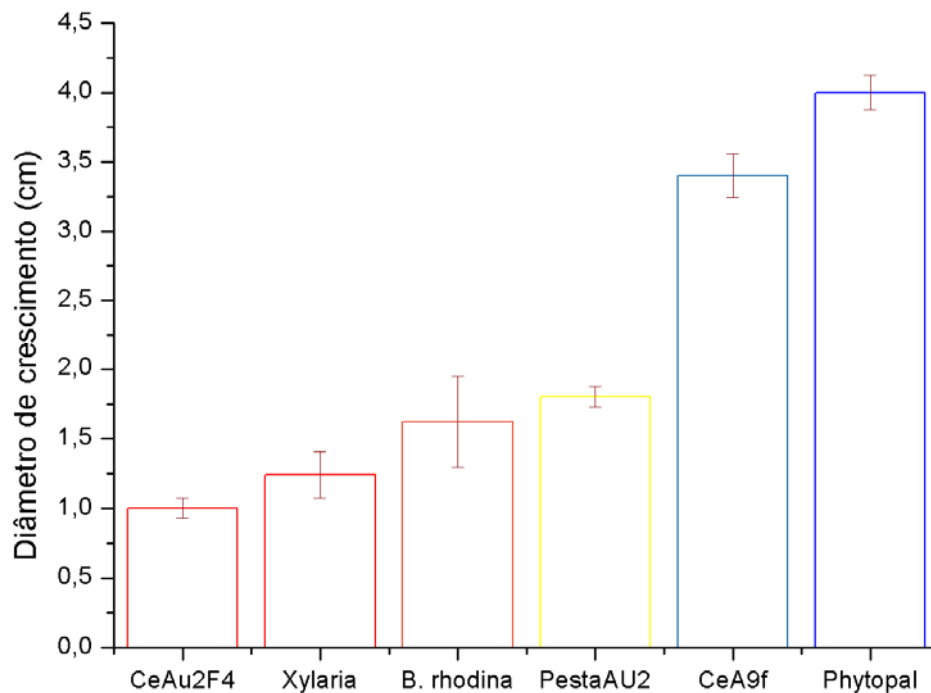


Figura 21. Redução do crescimento de *Phytophthora palmivora* causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

Com relação ao fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, verifica-se que o seu crescimento micelial foi inibido por quatro fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* (Tabela 8).

TABELA 8. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de *C. echinata* (pau-brasil) e o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

Isolados	Tipo de interação	Inibição (%)
C.e.A6.F4.c.r.	3	0
C.e.A6.F4.c.b.	3	0
C.e.A9.f.	3	0
<i>Xylaria multiplex</i>	1	56,9
C.e.AU2.F1.f.	3	0
<i>B. rhodina</i>	1	78,5
C.e.AU2.F3.f.	3	0
C.e.AU2.F4.f.	3	0
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2	30,7
C.e.AU1.F1.f.	2	47,7

O fungo *Botryosphaeria rhodina* inibiu em 78,5% o crescimento micelial de *R. solani*, apresentando uma interação do tipo 1, sobrepondo o fitopatógeno em apenas três dias de cultivo (Figura 22).

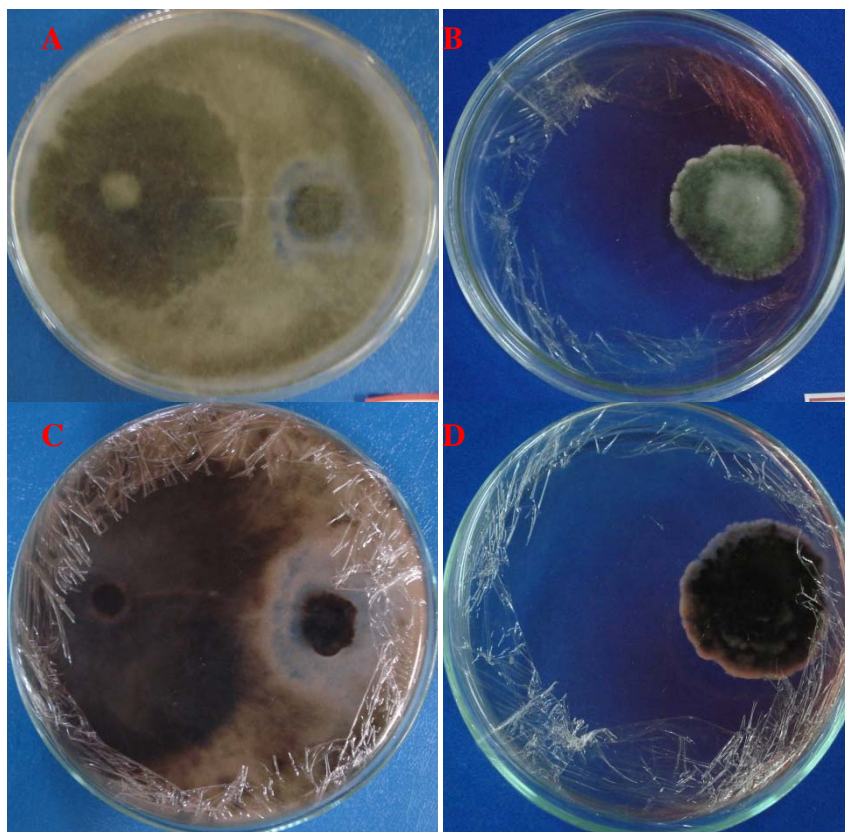


Figura 22. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *R. solani*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

A porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* por *B. rhodina* foi superior às porcentagens de inibição promovidas por nove isolados de *Trichoderma* spp., testados por Cúndom et al. (2003). A maior porcentagem de inibição promovida por esses fungos foi de 59%. Portanto, os resultados alcançados por *B. rhodina* são promissores na redução do crescimento micelial de *R. solani*.

O endofítico *Xylaria multiplex* inibiu o crescimento de *Rhizoctonia solani* em 56,9%, mas essa inibição só ocorreu após quinze dias de cultivo. Essa porcentagem de inibição foi superior às porcentagens de inibição de seis dos nove fungos isolados de *Trichoderma* ssp. antagonísticos de *R. solani* (Cúndom et al., 2003).

O fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, quando cultivado isolado na placa de Petri, liberou uma substância de cor rosa para o meio. *Xylaria multiplex* ao sobrepor o fungo *R. solani* impediu a liberação dessa substância (Figura 23). No estudo de Bayman et al. (1997), *Xylaria* e *Rhizoctonia* foram os gêneros mais freqüentes, isolados das raízes e das folhas de algumas espécies do gênero *Lephanthes* (Orchidaceae). No qual não ficou evidente a existência de

antagonismo entre *Xylaria* e *Rhizoctonia*, e em oito ocasiões ambos foram isolados do mesmo pequeno fragmento da raiz ou da folha. Em algumas espécies de orquídeas a presença de um desses endofíticos demonstrou a redução de infecção por outros fungos endofíticos.

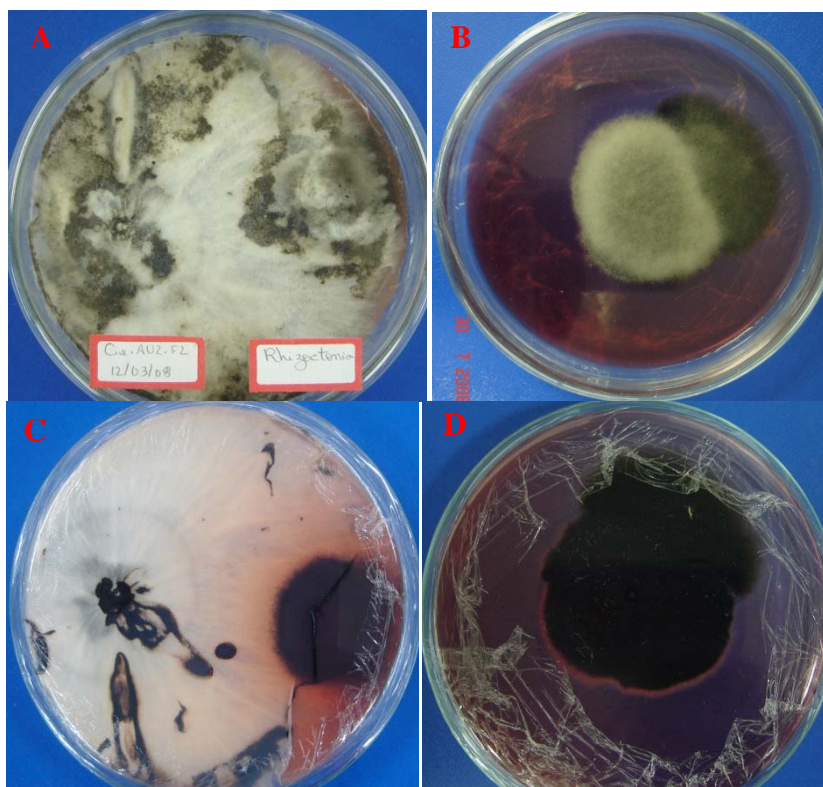


Figura 23. Antagonismo de *Xylaria multiplex* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *R. solani*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

Os fungos endofíticos codificado como C.e.AU1.F1.f e o *Pestalotiopsis* sp. inibiram o crescimento de *Rhizoctonia solani* em 47,7% e 30,7%, respectivamente, apresentando uma interação do tipo 2, ou seja, inibiram o crescimento do fitopatógeno, sem sobreposição de hifas. Os demais endofíticos apresentaram interações do tipo 3, havendo ausência de inibição do crescimento micelial de *R. solani*.

Botryosphaeria rhodina destacou-se dos demais, proporcionando redução de 78,5% no crescimento micelial de *R. solani*, diferindo significativamente dos demais endofíticos a nível de 5%, de acordo com o teste de Tukey. Não houve diferença significativa entre os endofíticos *Xylaria multiplex* e C.e.AU1.F1.f (Figura 24).

No estudo de Remuska e Pria (2007) as porcentagens de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* pelos antagonistas *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. foram de 12,4% e 0,63%, respectivamente. Porcentagens de inibição bastante inferiores às

proporcionadas pelos endofíticos *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex*, C.e.AU1.F1.f e *Pestalotiopsis* sp.

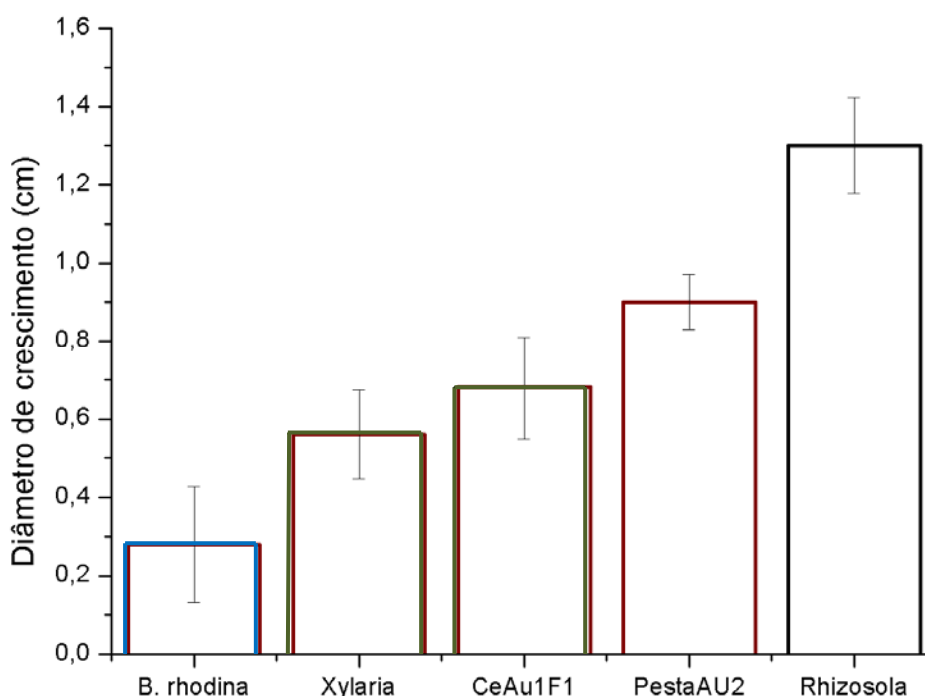


Figura 24. Redução do crescimento de *Rhizoctonia solani* causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que esses endofíticos de *C. echinata* são potenciais antagonistas do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

No antagonismo frente ao fungo *Phomopsis* sp., apenas três endofíticos de *C. echinata* inibiram o crescimento micelial desse patógeno (Tabela 9).

TABELA 9. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de *C. echinata* (pau-brasil) e o fitopatógeno *Phomopsis* sp.

Isolados	Tipo de interação	Inibição (%)
C.e.A6.F4.c.r.	3	0
C.e.A6.F4.c.b.	3	0
C.e.A9.f.	3	0
<i>Xylaria multiplex</i>	2	42,6
C.e.AU2.F1.f.	3	0
<i>B. rhodina</i>	1	91,7
C.e.AU2.F3.f.	3	0
C.e.AU2.F4.f.	3	0
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2	65,2
C.e.AU1.F1.f.	3	0

Botryosphaeria rhodina inibiu em 91,7% o crescimento micelial de *Phomopsis* sp., apresentando uma interação do tipo 1, havendo a sobreposição do fitopatôgeno em apenas três dias de cultivo (Figura 25). Foi observado que *Phomopsis* sp. liberava substâncias voláteis com cheiro de rosas, mas no antagonismo *B. rhodina* impediu a liberação de tais substâncias, não podendo ser sentido esse cheiro característico que exalava das placas de Petri, nas quais *Phomopsis* sp. encontrava-se isolado.

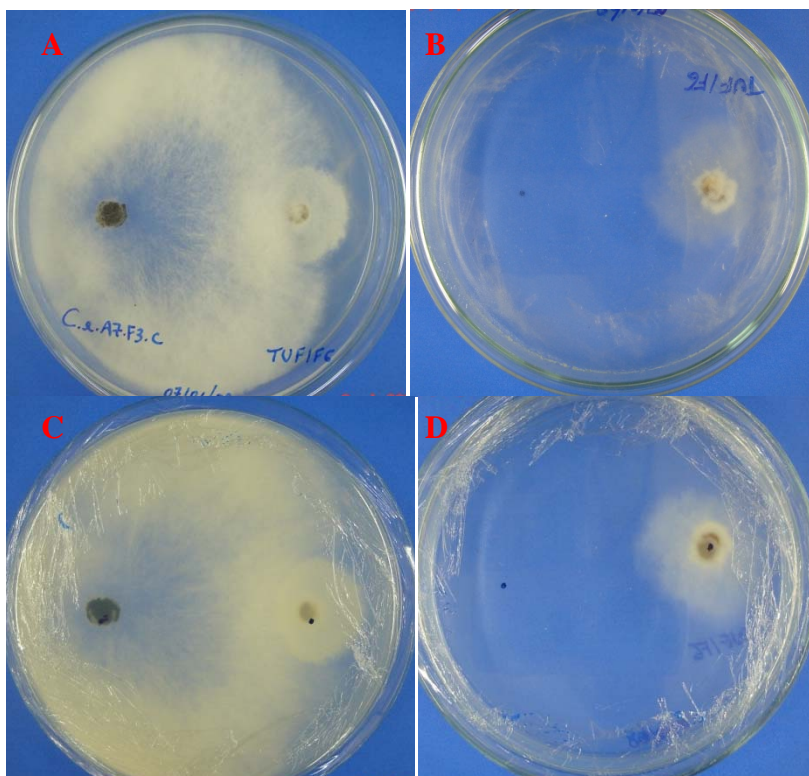


Figura 25. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phomopsis* sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 3 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *Phomopsis* sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

O endofítico *Pestalotiopsis* sp. inibiu em 65,2% o crescimento de *Phomopsis* sp., a interação entre eles foi do tipo 2, não havendo sobreposição, mas pode ser observado um halo de inibição (Figura 26). Dos endofíticos que inibiram o crescimento micelial de *Phomopsis* sp., *Xylaria multiplex* foi quem apresentou a menor porcentagem de inibição, correspondendo a 42,6%.



Figura 26. Antagonismo de *Pestalotiopsis* sp. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Phomopsis* sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *Phomopsis* sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa). Presença de halo de inibição.

A análise estatística demonstrou que há diferença significativa a nível de 5%, de acordo com o teste de Tukey, entre o controle e os isolados avaliados (Figura 27). E esses isolados de *C. echinata* diferem entre si.

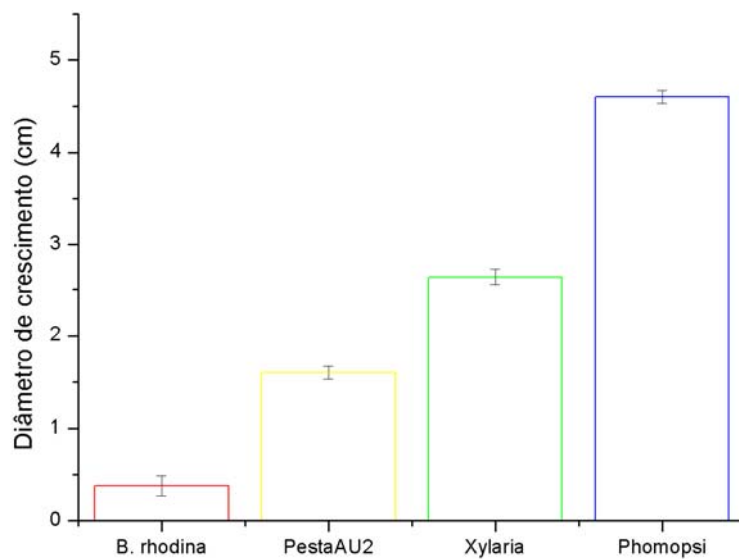


Figura 27. Redução do crescimento de *Phomopsis* sp. causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

No estudo desenvolvido por Assumpção et al. (2009), nenhum dos 69 isolados endofíticos de sementes de soja (*Glycine max*) apresentaram potencial antagonico frente ao fitopatogeno do genero *Phomopsis*. E este fungo é responsável pelo descarte de lotes de sementes de soja, na região do cerrado Brasileiro (Kimati et al., 1997). Uma vez que a soja tem destaque por ser uma das culturas mais rentáveis na agricultura mundial, tornam os resultados obtidos neste trabalho ainda mais interessantes e merecedores de investigações posteriores, como por exemplo, testes de antagonismo *in vivo* utilizando *Botryosphaeria rhodina* e *Pestalotiopsis* sp. como antagonicos de *Phomopsis* sp. isolado como fitopatogeno de soja.

Botryosphaeria rhodina foi responsável pela maior porcentagem de inibição, 88,8%, no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (Tabela 10), havendo a interação do tipo 1, onde a sobreposição proporcionada por *B. rhodina* ocorreu em apenas três dias de cultivo (Figura 28).

Xylaria multiplex também apresentou uma alta porcentagem de inibição, 69,8%, apresentando também uma interação do tipo sobrepondo o fitopatogeno, após quinze dias de cultivo (Figura 29).

TABELA 10. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de *C. echinata* (pau-brasil) e o fitopatogeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

Isolados	Tipo de interação	Inibição (%)
C.e.A6.F4.c.r.	3	0
C.e.A6.F4.c.b.	3	0
C.e.A9.f.	3	0
<i>Xylaria multiplex</i>	1	69,8
C.e.AU2.F1.f.	3	0
<i>B. rhodina</i>	1	88,8
C.e.AU2.F3.f.	3	0
C.e.AU2.F4.f.	2	52,5
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	NT	NT
C.e.AU1.F1.f.	2	34,6

NT – não foi testado

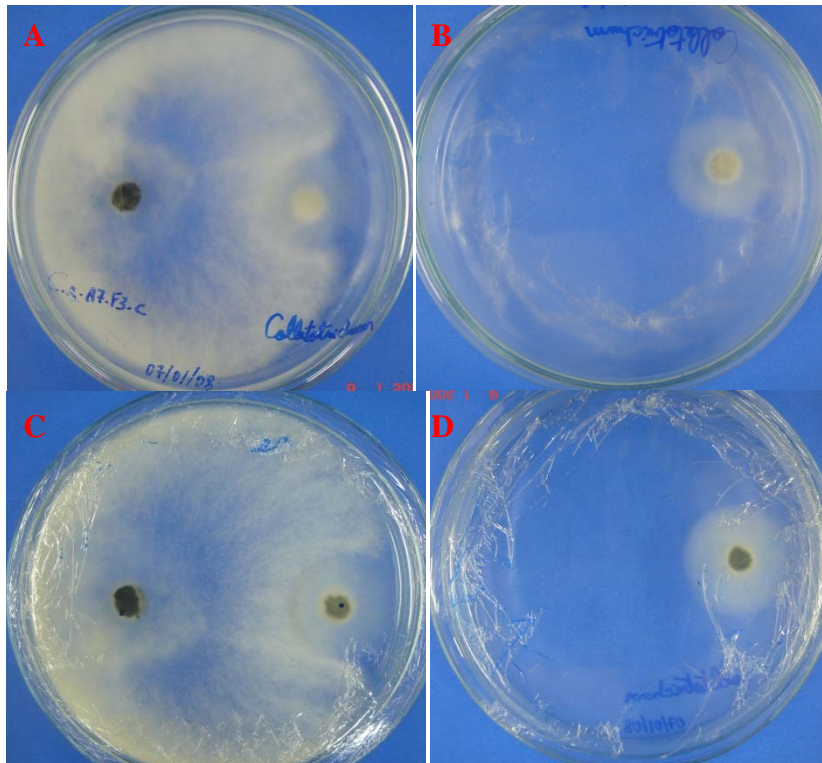


Figura 28. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 3 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *C. gloeosporioides*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

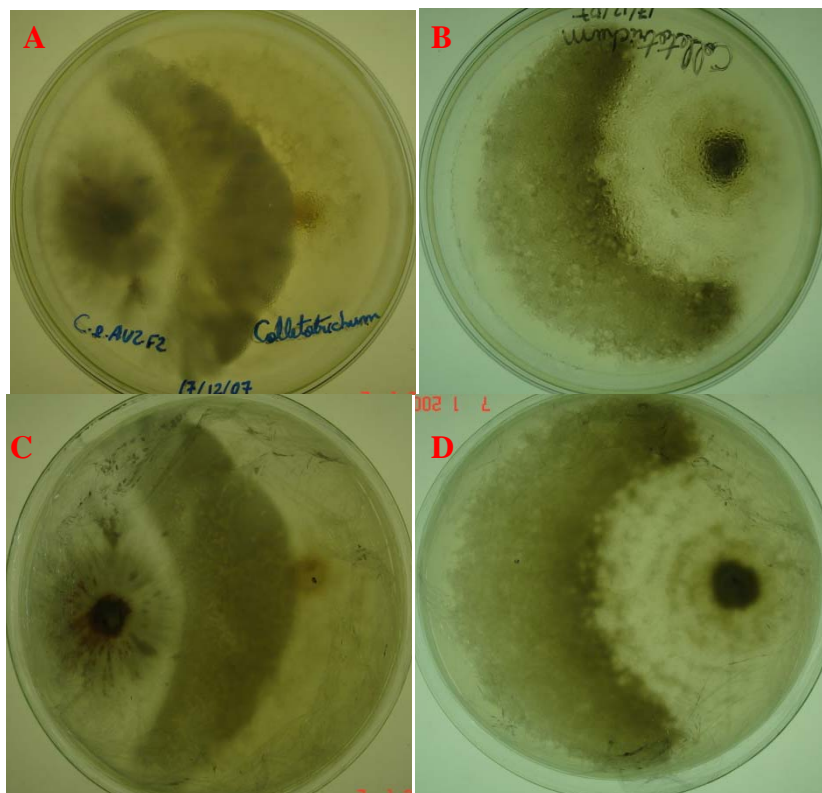


Figura 29. Antagonismo de *Xylaria multiplex* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *C. gloeosporioides*, nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

Os endofíticos codificados como C.e.AU2.F4.f. e C.e.AU1.F1.f. reduziram o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em 52,5% e 34,6%, respectivamente.

Houve uma diferença significativa a nível de 5%, de acordo com o teste de Tukey, entre o controle e os isolados avaliados (Figura 30). A redução do crescimento micelial do fitopatógeno por *B. rhodina* diferiu significativamente dos demais endofíticos. *Xylaria multiplex* e C.e.AU2.F4.f. não apresentaram diferença significativa entre si, na redução de *C. gloeosporioides*. C.e.AU1.F1.f. apesar de ter promovido a menor porcentagem de redução do fitopatógeno, pode-se observar uma diferença significativa ao compará-lo ao controle.

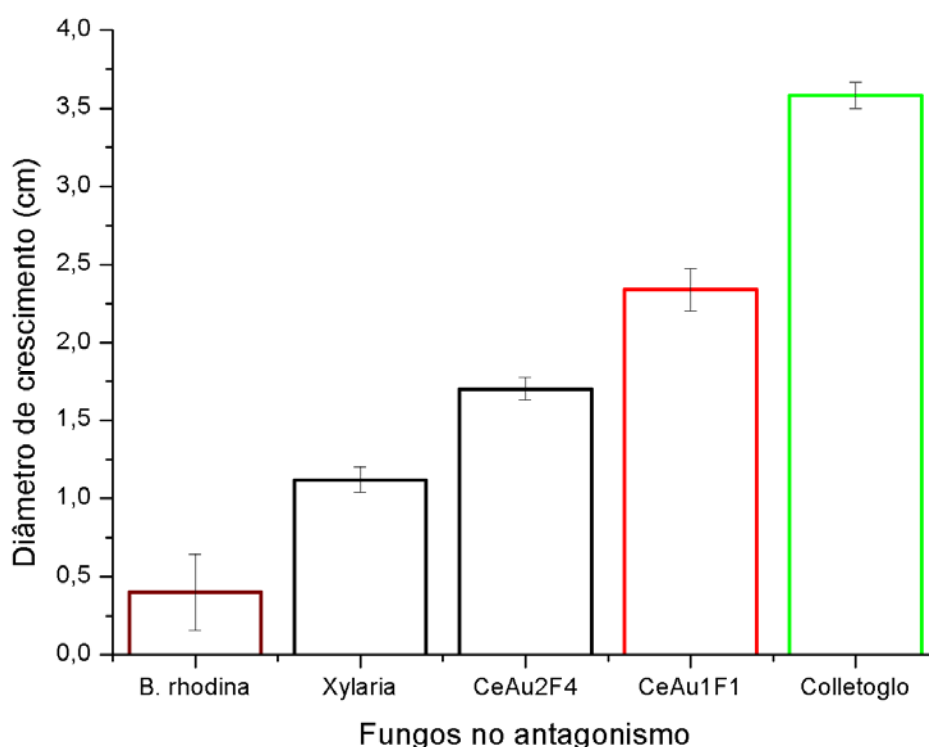


Figura 30. Redução do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

Segundo Kamati et al. (1997), alguns estudos realizados em laboratório revelaram a alta sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* à presença de *Trichoderma* spp. que além de inibirem o crescimento desse patógeno, provocaram alterações morfológicas nas células das hifas em decorrência do antagonismo.

No estudo desenvolvido por Martins et al. (2007) todos os isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento de *C. gloeosporioides*, e alguns isolados apresentaram esporulação sobre o fitopatógeno, sendo considerados altamente antagonistas.

Prapagdee et al. (2008) ao testar o antagonismo do actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus* contra *C. gloeosporioides* obteve porcentagens de inibição do crescimento

micelial inferiores aos demonstrados por *B. rhodina*, *Xylaria multiplex*, C.e.AU2.F4.f. e C.e.AU1.F1.f. O melhor resultado alcançado por *S. hygroscopicus* sobre o fitopatógeno foi uma inibição de 47,3% do crescimento micelial, os demais resultados as taxas de inibição ficaram abaixo de 25%.

Pestalotiopsis sp. não pode ser testado frente ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* porque esse endofítico foi isolado posteriormente, e quando seria testado contra *C. gloeosporioides*, a colônia do fitopatógeno estava contaminada.

Dos endofíticos de *C. echinata*, sete foram antagonistas do fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp. (Tabela 11).

TABELA 11. Tipos de interação e porcentagem de inibição entre os fungos endofíticos, isolados de *C. echinata* (pau-brasil) e o fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp.

Isolados	Tipo de interação	Inibição (%)
C.e.A6.F4.c.r.	3	0
C.e.A6.F4.c.b.	3	0
C.e.A9.f.	3	8,6
<i>Xylaria multiplex</i>	2	32,6
C.e.AU2.F1.f.	3	8,6
<i>B. rhodina</i>	1	57,7
C.e.AU2.F3.f.	2	28,6
C.e.AU2.F4.f.	2	37,1
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2	54,3
C.e.AU1.F1.f.	3	0

Botryosphaeria rhodina inibiu em 57,7 % o crescimento micelial do fungo fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp., apresentando uma interação do tipo 1, sobrepondo-o (Figura 31).

O fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp. isolado na placa de Petri, após oito dias produziu um grande número de conídios, porém no antagonismo com *B. rhodina* não houve a produção de conídios, o que indica que *B. rhodina* impediu a produção dessas estruturas de resistência. A redução na produção de conídios e na taxa de crescimento micelial são importantes características a serem observadas no potencial desempenho de um antagonista.

Dos endofíticos antagonistas de *Pestalotiopsis* sp., o endofítico *Pestalotiopsis* sp. foi quem apresentou a segunda maior porcentagem de inibição, de 54,3%. A interação foi do tipo 2, havendo a formação de um halo de inibição (Figura 32).

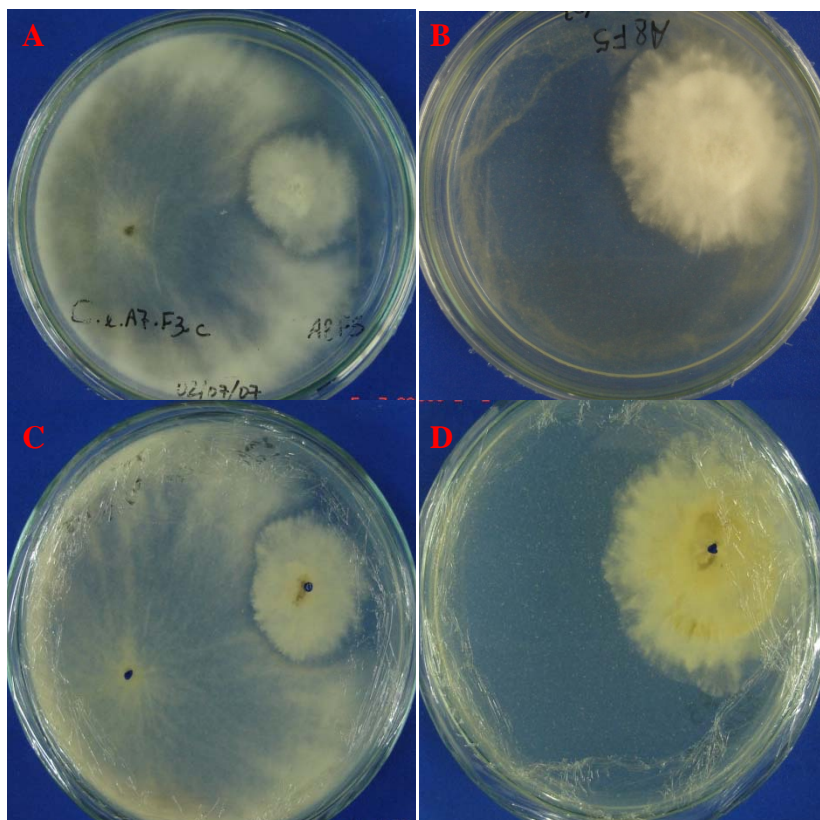


Figura 31. Antagonismo de *Botryosphaeria rhodina* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Pestalotiopsis* sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 3 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *Pestalotiopsis* sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

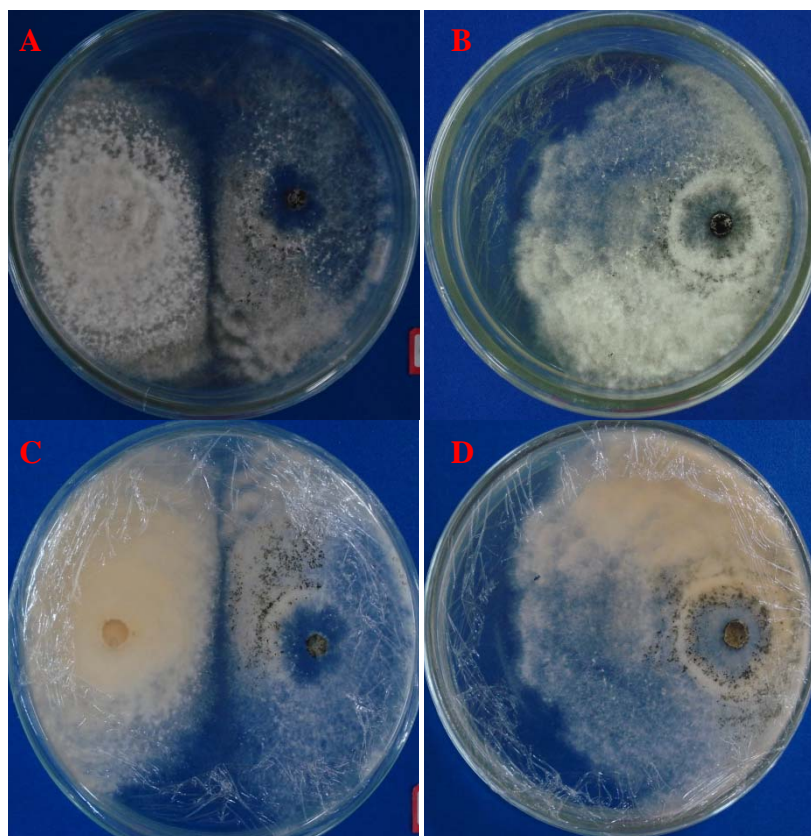


Figura 32. Antagonismo do endofítico *Pestalotiopsis* sp. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Pestalotiopsis* sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *Pestalotiopsis* sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

O endofítico C.e.AU2.F4.f. foi responsável pela redução de 37,1% do crescimento micelial do *Pestalotiopsis* sp., mas não sobrepôs (Figura 33).

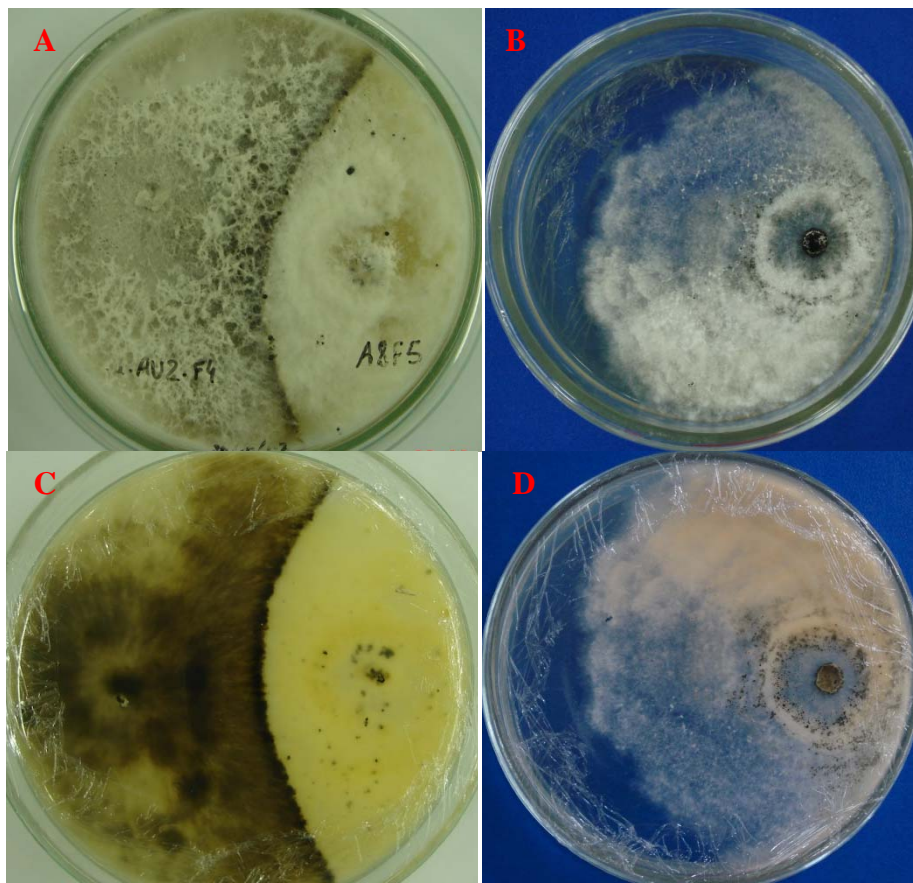


Figura 33. Antagonismo do endofítico C.e.AU2.F4.f. (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Pestalotiopsis* sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *Pestalotiopsis* sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

Através dos testes de antagonismo, pode-se comprovar que *Xylaria multiplex* também possui um potencial antagônico contra esse fitopatógeno (Figura 34), mas as ações antagônicas só puderam ser observadas após quinze dias de cultivo, apresentando um porcentagem de inibição de 32,6%, havendo uma interação do tipo 2, ou seja, *Xylaria* sp. não sobrepôs o fitopatógeno, mas pode ter ocorrido redução na esporulação do *Pestalotiopsis* sp., uma vez que pontos escuros observados nas placas, no crescimento do fitopatógeno isolado, não foram observados nas placas, onde *Pestalotiopsis* sp. está pareado com o endofítico *Xylaria multiplex*.

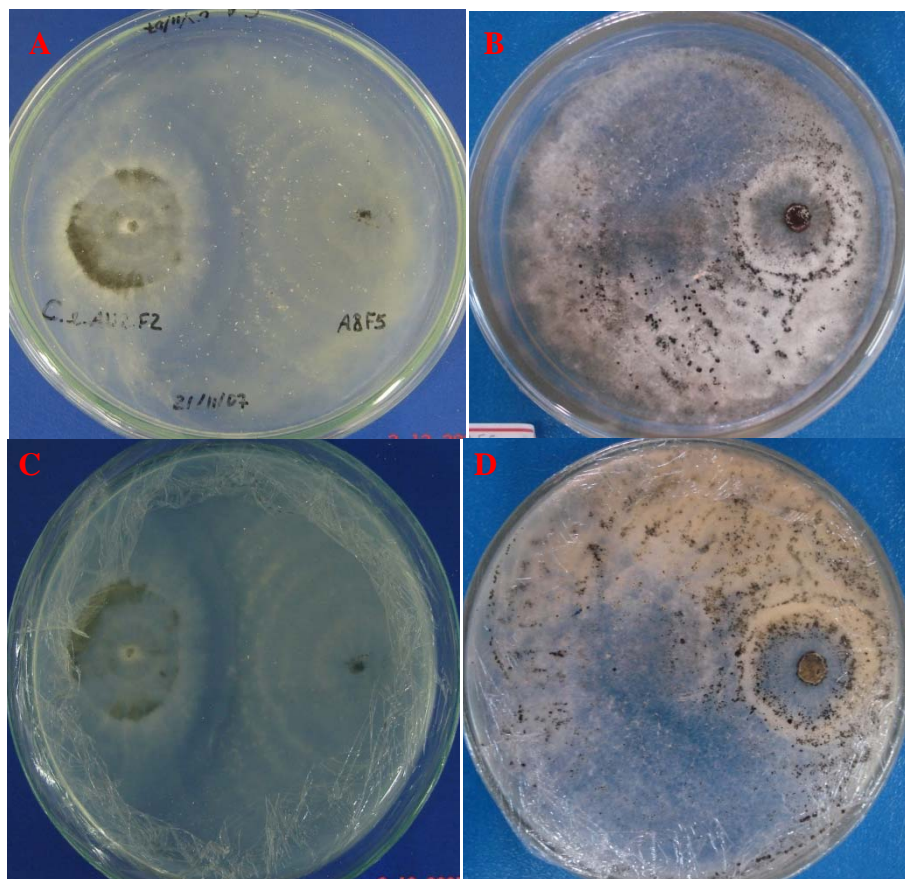


Figura 34. Antagonismo de *Xylaria multiplex* (lado esquerdo da placa) contra o fungo fitopatogênico *Pestalotiopsis* sp. (A-frente da placa; C-verso da placa), após 15 dias, em meio BDA, a 28°C. Controle – *Pestalotiopsis* sp., nas mesmas condições de cultivo, sem o endofítico (B-frente da placa; D-verso da placa).

Dos sete isolados de *Caesalpinia echinata* que inibiram o crescimento do *Pestalotiopsis* sp., os endofíticos C.e.A9.f. e C.e.AU2.F1.f. que apresentaram interação do tipo 3, não inibiram significativamente, a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey, o crescimento micelial do fitopatogênico. Os endofíticos *B. rhodina* e *Pestalotiopsis* sp. inibiram significativamente o fitopatogênico *Pestalotiopsis* sp., mas a inibição não foi significativa entre os endofíticos, a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey. C.e.AU2.F4.f., *Xylaria multiplex* e C.e.AU2.F3.f. inibiram significativamente o crescimento do fitopatogênico, diferindo significativamente das inibições provocadas por *B. rhodina* e *Pestalotiopsis* sp. (Figura 35).

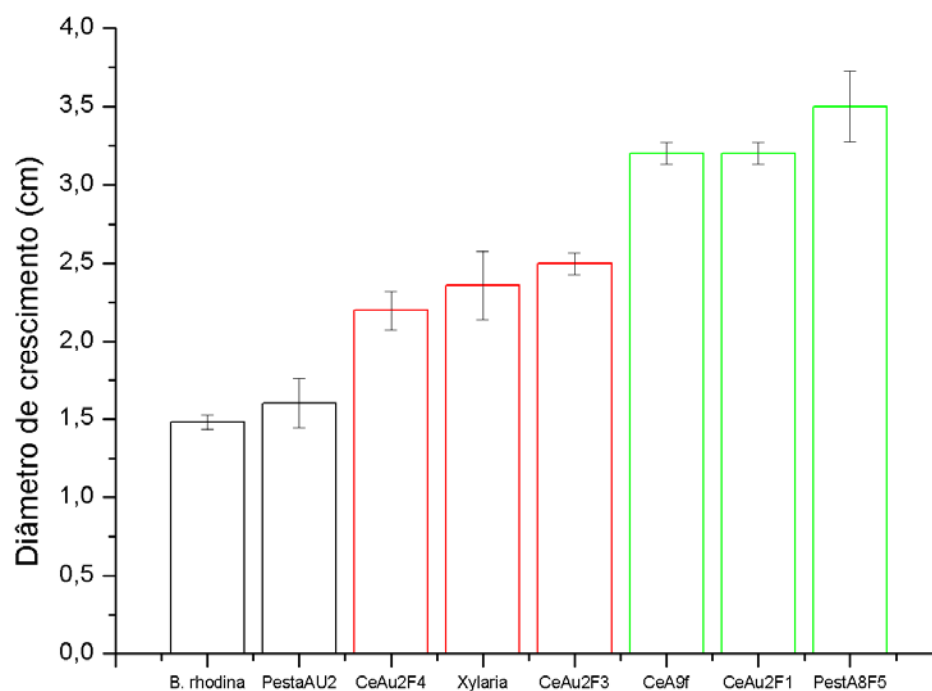


Figura 35. Redução do crescimento de *Pestalotiopsis* sp. causada pelos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* em cultura pareada. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

Comparando-se os três antagonistas, *Botryosphaeria rhodina* mostrou-se mais eficiente do que *Pestalotiopsis* sp. e *Xylaria multiplex*, apresentando uma maior porcentagem de inibição do crescimento micelial em relação a um maior número de fitopatógenos.

O endofítico *Pestalotiopsis* sp. foi um bom antagonista, apresentado uma redução superior a 50% no crescimento de quase todos os fitopatógenos, porém apresentou uma menor porcentagem de inibição frente ao fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Mas, esse percentual de inibição foi superior a outros antagonistas de *R. solani*, como *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. que apresentaram uma porcentagem de inibição de 12,4 e 0,63%, respectivamente (Remuska; Pria, 2007). Porém, no estudo desenvolvido por Cúndom et al. (2003) os nove isolados de *Trichoderma* spp. mostraram-se eficientes como antagonistas, apresentando porcentagens de inibição de *R. solani* significativas, acima de 38%.

No trabalho desenvolvido por Maki (2006), ao testar o potencial de inibição dos endofíticos do cacaueteiro frente a fitopatógenos, foram utilizados *Phytophthora palmivora* e *Rhizoctonia solani*, entre outros. Nos testes não foram observados nenhum indício de inibição. Para a autora, talvez esse resultado tenha ocorrido pelo fato dos fitopatógenos terem sido isolados de outras culturas. No presente estudo, apenas o fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp. foi isolado de *C. echinata*, e no entanto todos os fitopatógenos foram inibidos pelos endofíticos *B. rhodina*, *Xylaria multiplex* e *Pestalotiopsis* sp.

Xylaria multiplex apresentou porcentagens significativas de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos, mas no antagonismo contra *Pestalotiopsis* sp. apresentou uma menor porcentagem de inibição em relação aos demais fitopatógenos. Ao comparar a ação do *Xylaria multiplex* com as ações antagônicas de *Botryosphaeria rhodina* e *Pestalotiopsis* sp., esse endofítico apresentou os menores percentuais de inibição frente aos fitopatógenos *Pythium* sp. e *Phomopsis* sp.

Os resultados apresentados aqui demonstram o grande potencial que os endofíticos *Botryosphaeria rhodina*, *Pestalotiopsis* sp. e *Xylaria multiplex* possuem como agentes de controle dos fitopatógenos *Pythium debaryanum*, *Phytophthora palmivora*, *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Pestalotiopsis* sp. Até o momento nenhum estudo foi desenvolvido utilizando *Botryosphaeria rhodina* como antagonista desses fungos fitopatógenos. Porém, o fato desse fungo ser patógeno de inúmeras culturas (Ribeiro et al., 1992; Rahakrishnan e Mammooty, 1979; Souza Filho et al., 1979; Warwick, 1990; RAM, 1988; Ponte, 1985; Freire et al., 2004) inviabiliza a sua utilização *in vivo*. Uma alternativa para sua utilização no biocontrole desses fitopatógenos seria através do isolamento e utilização de compostos produzidos por *B. rhodina*. Sendo necessários testes preliminares *in vitro* para verificar a ação desses compostos frente aos patógenos.

As interações do tipo 1, nas quais ocorreram as sobreposições das hifas dos endófitos sobre os fitopatógenos, sugere a ocorrência de parasitismo. Porém, nos estudos em nível citológico, por meio de pareamento em lâminas de microcultivo, não foi possível inferir sobre o tipo de interação que ocorreu entre as hifas dos endofíticos em relação a dos fitopatógenos. Também não podem ser observadas as alterações nas esporulações dos fitopatógenos.

5.4. Conclusões

Nas condições de desenvolvimento deste estudo, pode-se concluir que:

- Os fungos endofíticos *Pestalotiopsis* sp., *Xylaria multiplex* e *Botryosphaeria rhodina* foram os mais eficazes antagonistas de *Pythium debaryanum* e *Phytophthora palmivora*.

- Os resultados obtidos no antagonismo *in vitro* evidenciam a possibilidade da aplicação dos extratos produzidos a partir dos endofíticos *Botryosphaeria rhodina* e *Xylaria multiplex* no controle biológico dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

- O crescimento micelial de *Phomopsis* sp. só foi inibido pelos endofíticos *B. rhodina*, *Pestalotiopsis* sp. e *X. multiplex*.
- Os isolados *Pestalotiopsis* sp., *Botryosphaeria rhodina* e *Xylaria multiplex* foram os mais eficientes na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp.
- Os demais endofíticos não inibiram o crescimento dos fitopatógenos e quando apresentaram alguma inibição, não foi significativa.

6. CAPÍTULO III: Efeito dos extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam. sobre microrganismos

6.1. Introdução

Os microrganismos endofíticos ocupam nicho ecológico semelhante ao ocupado pelos fitopatógenos, o que proporciona a esses organismos um importante papel no controle biológico desses patógenos. Diversos trabalhos têm demonstrado que a associação de alguns endofíticos a plantas tem lhes proporcionado resistência a vários patógenos, como microrganismos, insetos, animais herbívoros, entre outros. Esse biocontrole está associado à capacidade dos endofíticos produzirem metabólitos secundários bioativos. A produção de antibióticos confere vantagens ao endofíticos dentro da planta, uma vez que vão atuar inibindo ou mesmo matando os demais microrganismos, diminuindo assim a competição por espaço e por nutrientes (Schuz et al., 2002; Pileggi et al., 2002; Daisy et al., 2002; Wiyakrutta et al., 2004; Phongpaichit et al., 2006; Akello et al., 2008; Sikora et al., 2008; Gong e Guo, 2009).

Alguns metabólitos secundários produzidos por plantas têm sido isolados do cultivo de endofíticos, demonstrando a capacidade desses microrganismos em produzir os mesmos compostos isolados de suas plantas hospedeiras. Para obtenção de extratos de plantas faz-se necessário uma grande quantidade de material vegetal, a exemplo do taxol que para obtenção de 1 Kg são utilizadas as cascas de mais de 1000 árvores (Kieran et al., 1997). Isso implica em danos irreparáveis para a planta, como a penetração de microrganismos patógenos oportunistas através de ferimentos causados durante a remoção de ramos, podendo vir a causar inúmeras doenças e até mesmo a morte da planta. E a perda excessiva de biomassa também pode levar a morte do vegetal. Isolar microrganismos endofíticos, com a capacidade de produção de metabólitos secundários, seria uma forma de evitar esses danos, principalmente quando a planta utilizada é uma espécie ameaçada de extinção, como no caso de *Caesalpinia echinata*. Diversos estudos têm sido desenvolvidos isolando endofíticos de plantas medicinais (Strobel et al., 1999b; Lu et al., 2000; Rodrigues et al., 2000; Huang et al., 2001; Wang et al., 2002; Pileggi et al., 2002; Corrado; Rodrigues, 2004; Li et al., 2005; Silva et al., 2005; Wang et al., 2006; Phongpaichit et al., 2006; Tayung; Jha, 2006; Ghadin et al., 2008; Yin et al., 2009; Gong; Guo, 2009; Qin et al., 2009), obtendo a partir desses fungos

compostos com potencial atividade antimicrobiana. Rocha (2004) relaciona algumas propriedades medicinais de *C. echinata*.

A seleção de um meio de cultivo ideal para a produção fúngica é de suma importância, assim como as condições adequadas de cultivo para que haja um bom crescimento fúngico com alta esporulação (Barbosa et al., 2002). O meio de cultivo também influencia na produção de metabólitos secundários pelos fungos endofíticos. Os compostos produzidos por endofíticos têm sido utilizados em testes frente a patógenos humanos e têm alcançado resultados promissores (Horn et al., 1995; Lee et al., 1996; Calistru et al., 1997; Pelaéz et al., 1998; Guo et al., 1998; Rodrigues et al., 2000; Isaka et al., 2001; Strobel, 2003; Pinto, 2003; Liu et al., 2004; Cafêu et al., 2005; Guimarães, 2006; Hussain et al., 2007; Aly et al., 2008; Gogoi et al., 2008; Ding et al., 2008).

O uso indiscriminado de antibiótico e outros fatores têm contribuído para o aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, impulsionando uma constante busca por novos agentes que possam combater as infecções causadas por esses microrganismos (Strobel et al., 1999b; Rodrigues et al., 2000; Krohn et al., 2001; Wang et al., 2006; Ghadin et al., 2008; Yin et al., 2009).

Ainda existe uma grande quantidade de endofíticos, cujos metabólitos secundários não foram isolados. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo obter metabólitos secundários a partir de endofíticos, isolados de *C. echinata*, caracterizá-los de acordo a composição química e testar a atividade antimicrobiana desses compostos, contribuindo para o conhecimento do potencial biotecnológico desses microrganismos.

6.2. Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Plantas e de Microrganismos Endofíticos do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e no Centro de Patologia e Medicina Laboratorial, da Universidade Estadual de Ciências e da Saúde de Alagoas (UNCISAL), contando com a colaboração do Prof. Dr. Zenaldo Porfírio.

6.2.1. Obtenção dos fungos endofíticos

Foram utilizados os fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata*, *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex* e *Pestalotiopsis* sp. que inibiram *in vitro* os fitopatógenos *Pythium*

debaryanum, *Phytophthora palmivora*, *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Pestalotiopsis* sp., em ensaios de antagonismo. Também foi utilizado o endofítico C.e.A6.F4.c.b. que foi selecionado por ter secretado uma substância oleosa, no cultivo em meio BD.

6.2.2. Meios de cultura utilizados

6.2.2.1. Meio Batata Dextrose (BD):

Discos de batata descascada	200 g
Dextrose	20 g
Água destilada	1000 mL
pH	5,87

Os discos de batata foram fervidos em 500 mL de água destilada por 30 minutos. Após filtração através de gaze, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 mol.L⁻¹.

6.2.2.2. Meio Batata Cenoura (BC):

Discos de batata descascada	20 g
Discos de cenoura descascada	20 g
Água destilada	1000 mL
pH	5,9

Os discos de batata e cenoura foram colocados em 500 mL de água destilada, durante 60 minutos e depois foram fervidos durante 5 minutos. O caldo foi filtrado através de gaze. Ajustou-se o volume para 1000 mL, mediu-se o pH e o meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos.

6.2.2.3. Caldo de Batata-Doce (CBD):

Discos de batata-doce descascada	250 g
Dextrose	20 g

Água destilada	1000 mL
pH	5,9

Os discos de batata-doce foram fervidos em 500 mL de água destilada por 50 minutos e em seguida o caldo foi filtrado em gaze. Adicionou-se a dextrose e ajustou o volume com água destilada para 1000 mL. O caldo foi esterilizado em autoclave por 20 minutos.

6.2.2.4. Caldo de Cenoura (CC):

Cenoura triturada	20 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,13

A cenoura triturada foi colocada em 500 mL de água destilada por 60 minutos, logo após ferveu-se por 5 minutos e em seguida o caldo foi filtrado em gaze. O volume foi ajustado com água destilada para 1000 mL. O caldo foi esterilizado em autoclave por 20 minutos.

6.2.2.5. Batata-Sacarose (BS):

Discos de batata descascada	200 g
Sacarose	20 g
Água destilada	1000 mL
pH	5,87

Os discos de batata-doce foram fervidos em 500 mL de água destilada por 50 minutos e em seguida o caldo foi filtrado em gaze. Adicionou-se a sacarose e ajustou o volume com água destilada para 1000 mL. O caldo foi esterilizado em autoclave por 20 minutos.

6.2.2.6. Meio Ágar Mueller-Hinton (MHA)

Infusão de carne bovina	30 g
Peptona de caseína ácida	17,5 g
Amido	1,5 g

Ágar	17 g
Água destilada	1000 mL
pH	5,8

Todos os ingredientes foram misturados em água destilada, sob agitação, exceto o ágar. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. Sendo o pH ajustado com NaOH 1 mol.L⁻¹ antes de adicionar o ágar.

6.2.3. Cultivo dos fungos endofíticos em meios líquidos

Os fungos endofíticos que estavam sendo cultivados em placas de Petri, no meio BDA, pH 6,8, a temperatura de 28° C, foram inicialmente transferidos, com o auxílio de um vazador de rolhas, sendo retirado um cilindro de 6 mm de diâmetro e em seguida inoculado em 100 mL de meio líquido de Batata Dextrose (BD). Posteriormente, foram cultivados no meio Batata Cenoura (BC), Caldo de Batata-Doce (CBD), Caldo de Cenoura (CC) e Batata Sacarose (BS), em um volume de 100 mL, visando à determinação dos meios mais adequados para uma melhor produção de massa fúngica e posterior produção de metabólitos secundários. Além disso, os Erlenmeyer foram colocados no claro sem e com agitação (100 rpm), e no escuro com e sem agitação. Foram utilizados três repetições para cada fungo selecionado. Após o tempo de incubação de 30 dias estes foram analisados quanto a produção de massa fúngica e de extratos. A cultura foi filtrada em camada dupla de filtro de papel, após a aplicação de etanol 92,5%. O micélio retido foi seco em estufa a 60° C, após a secagem o crescimento da colônia foi avaliado pela pesagem da biomassa seca dos micélios.

6.2.4. Preparação dos extratos produzidos pelos fungos endofíticos

A partir das massas fúngicas produzidas pelos fungos endofíticos *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex*, C.e.A6.F4.c.b. e *Pestalotiopsis* sp., os extratos foram obtidos através de maceração e utilização de solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol), de acordo com a Figura 37. Após concentração das soluções em evaporador rotativo, cada extrato bruto foi individualmente suspenso em solução MeOH/H₂O e extraído com C₆H₁₄, CHCl₃ e AcOEt para obtenção de frações orgânicas mais elaboradas.

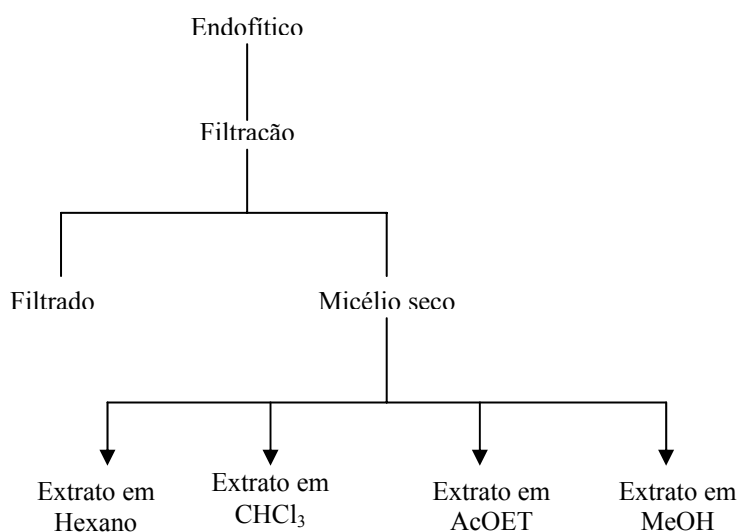


Figura 36. Modelo esquemático de extração de compostos químicos do micélio de fungos endofíticos.

6.2.5. Atividade antimicrobiana em meio sólido

Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi efetuada de acordo com a metodologia de difusão em ágar (Anesini; Perez, 1993). Os testes foram realizados no Centro de Patologia e Medicina Laboratorial, da Universidade Estadual de Ciências e da Saúde de Alagoas (UNCISAL), utilizando cepas multirresistentes isoladas de pacientes infectados, como as bactérias produtoras de ESBL (Betalactamases de Espectro Ampliado), que conferem ampla resistência aos antimicrobianos, e linhagens referência provenientes da ATCC (*American Type Culture Collection*), adquiridas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (Tabela 12). Foram utilizadas seis culturas, sendo quatro Gram-negativas: *Escherichia coli* (ESBL), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Klebsiella pneumoniae* (ESBL); e duas Gram-positivas, *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Staphylococcus aureus*.

TABELA 12. Linhagens referência utilizadas nos testes de atividade antibacteriana.

Linhagens referência	Nº de registro	Instituição fornecedora
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Escherichia coli</i>	Linhagem hospitalar	Universidade Estadual de Ciências e da Saúde de Alagoas
<i>Proteus vulgaris</i>	Linhagem hospitalar	Universidade Estadual de Ciências e da Saúde de Alagoas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Linhagem hospitalar	Universidade Estadual de Ciências e da Saúde de Alagoas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Linhagem hospitalar	Universidade Estadual de Ciências e da Saúde de Alagoas

As bactérias foram replicadas, com auxílio de *swabs* estéreis, em placas de Petri previamente preparadas com Ágar Mueller-Hinton. Os discos de papel estéreis (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 5 µL a cada quatro vezes, completando um total de 20 µL da solução dos extratos obtidos das massas dos endofíticos. Foram feitos testes preliminares utilizando a diluição de 5 mg/mL. Não havendo nenhuma atividade, aumentou-se as concentrações das soluções para 50 mg/mL e utilizou-se apenas três culturas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. O ensaio foi realizado em triplicata utilizando como controle positivo norfloxacina (100µg/mL) e como controle negativo os solventes metanol (CH₃OH), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (C₄H₈O₂) e hexano (C₆H₁₄). As placas foram encubadas em uma estufa, com uma temperatura de 37° C e os resultados foram lidos após 24 horas.

6.3. Resultados e discussão

Dentre os meios utilizados para o crescimento de *Botryosphaeria rhodina*, foi no meio Batata Dextrose (BD) que houve a maior produção de biomassa. Porém, não houve diferença significativa a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey, entre o meio BD e os meios Caldo de Batata-Doce (CBD) e Batata Sacarose (BS) (Figura 38). A produção de biomassa foi significativamente menor nos meios Batata Cenoura (BC) e Caldo de Cenoura (CC), não havendo diferença significativa entre esses meios.

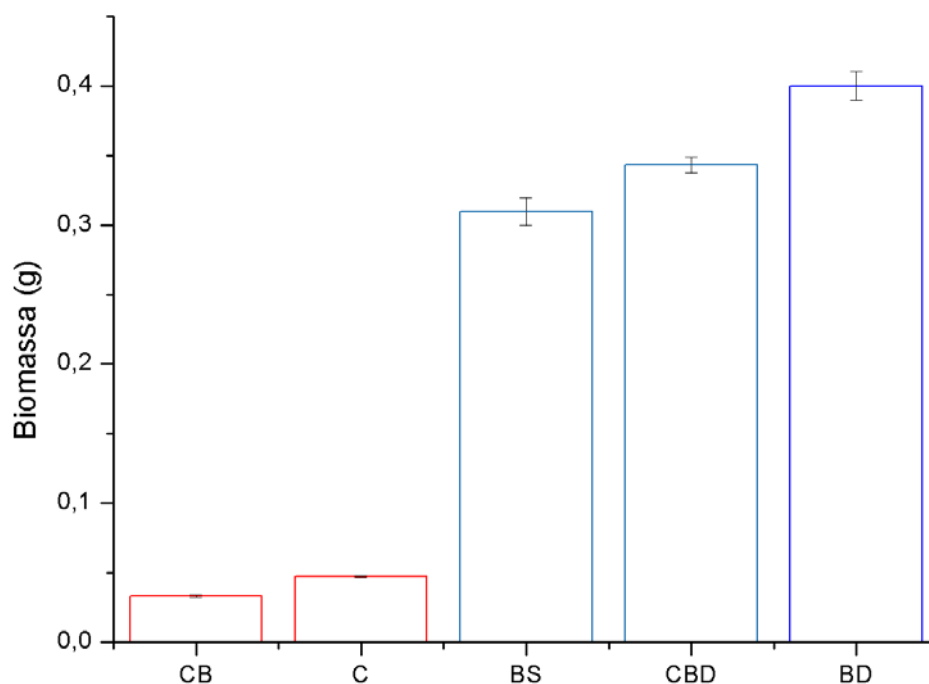


Figura 37. Produção de biomassa fúngica de *Botryosphaeria rhodina*, nos diferentes meios de cultivo: Batata Cenoura, Caldo de Cenoura, Batata Sacarose, Caldo de Batata Doce e Batata Dextrose. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

Botryosphaeria rhodina apresentou um maior crescimento de massa fúngica, no meio BD, crescendo no escuro, sem agitação, a temperatura de 28° C (Figura 39-A). Porém, não houve diferença significativa a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey, entre as massas fúngicas produzidas no escuro, com agitação e sem agitação (Figura 40). O crescimento no escuro diferiu significativamente do crescimento no claro. Mas, não houve diferença significativa entre os crescimentos no claro com agitação e sem agitação.

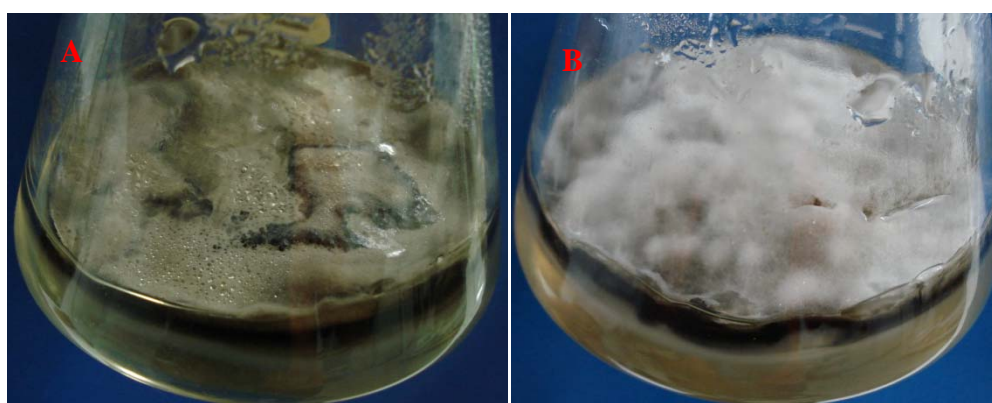


Figura 38. *Botryosphaeria rhodina* após trinta dias crescimento em meio BD, a temperatura de 28° C, no claro (A) e no escuro (B), sem agitação.

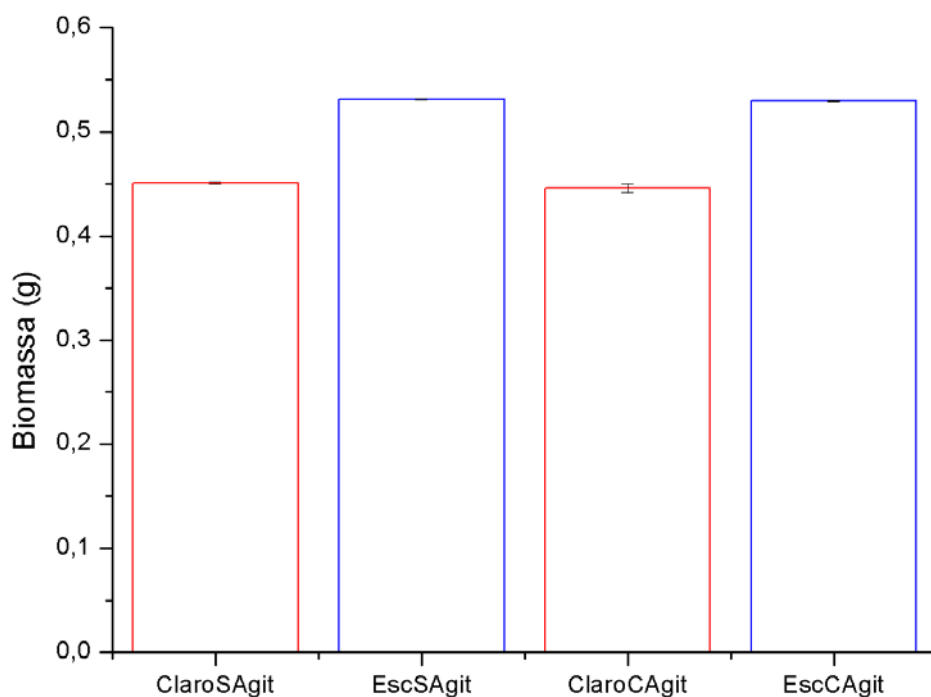


Figura 39. Produção de biomassa fúngica de *Botryosphaeria rhodina*, no meio BD, nas diferentes condições ambientais: no claro sem agitação, no escuro sem agitação, no claro com agitação e no escuro com agitação. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

As colônias de *B. rhodina*, após aproximadamente 15 dias de crescimento, tornam-se escuras, tanto em meio sólido quanto em meio líquido. Porém, ao crescer no escuro, as colônias permaneceram com aspectos claros, semelhante ao que ocorre no início do crescimento micelial.

Quanto a produção de biomassa de *Xylaria multiplex*, foi no meio Batata Dextrose (BD) que houve a maior produção, diferindo significativamente a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey, dos demais meios de cultivo utilizados (Figura 40). Entre os meios Caldo de Batata-Doce (CBD) e Batata Sacarose (BS) não houve diferença significativa. A produção de biomassa foi significativamente menor nos meios Batata Cenoura (BC) e Caldo de Cenoura (CC), não havendo diferença significativa entre esses meios, mas diferiram significativamente dos demais meios.

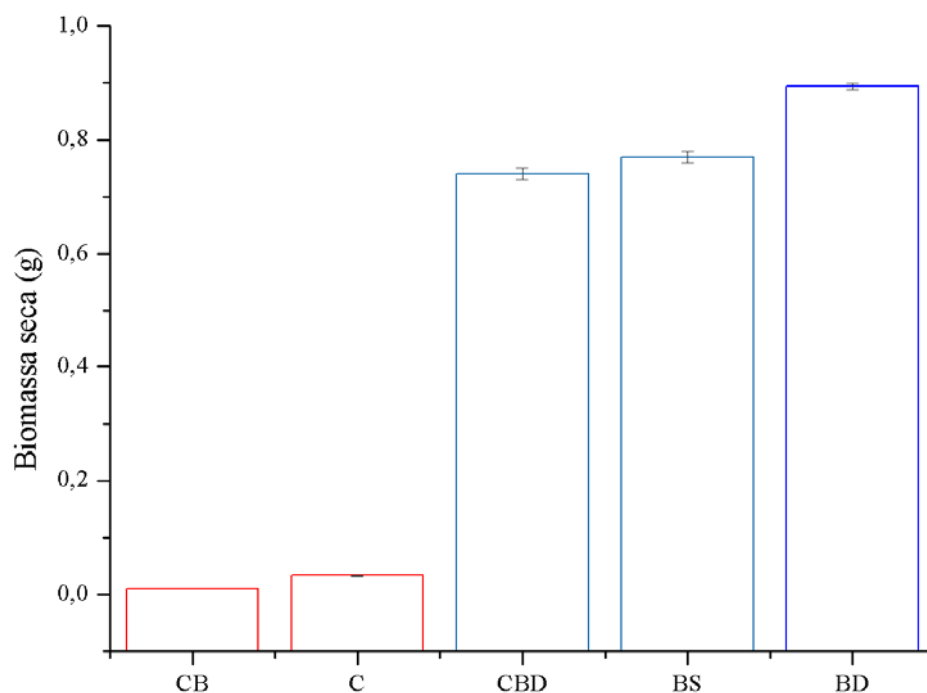


Figura 40. Produção de biomassa fúngica de *Xylaria multiplex*, nos diferentes meios de cultivo: Batata Cenoura, Caldo de Cenoura, Caldo de Batata Doce, Batata Sacarose e Batata Dextrose. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

O crescimento de *Xylaria multiplex* em meio BD, no claro apresentou um aspecto enegrecido, com estruturas de reprodução (Figura 41-A).

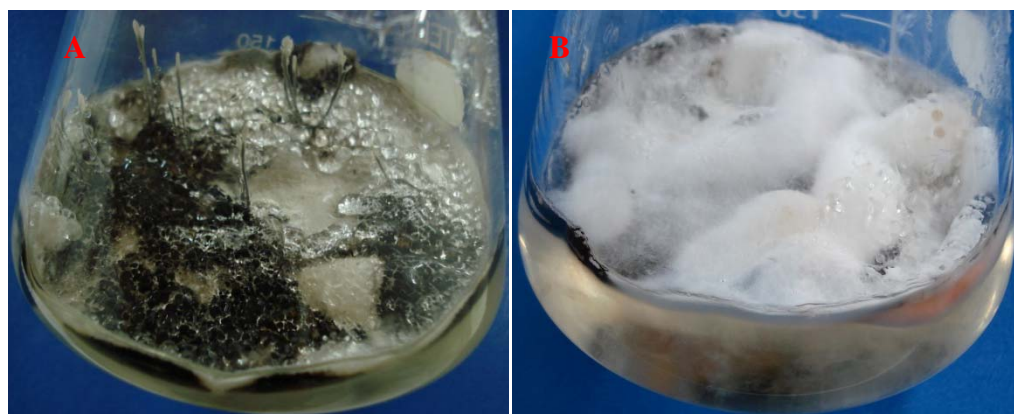


Figura 41. *Xylaria multiplex* após trinta dias crescimento em meio BD, a temperatura de 28° C, no claro (A) e no escuro (B), sem agitação.

Mas, a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey, houve diferença significativa na produção de biomassa de *Xylaria multiplex* nos diferentes tratamentos (Figura 42). No meio BD, no escuro, com e sem agitação houve a maior produção de massa fúngica.

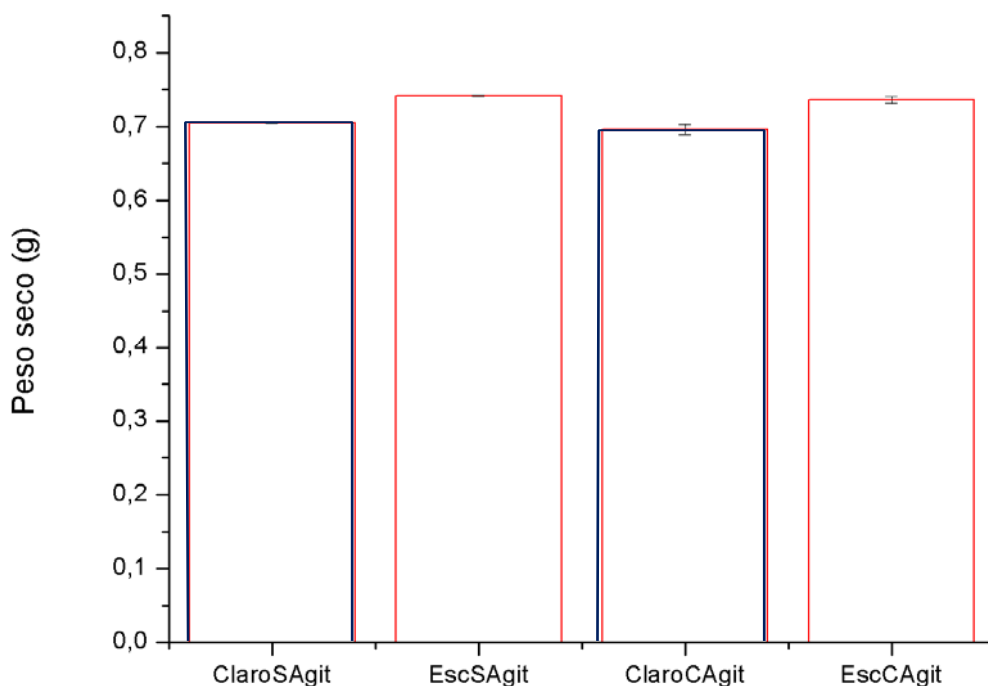


Figura 42. Produção de biomassa fúngica de *Xylaria multiplex*, no meio BD, nas diferentes condições ambientais: no claro sem agitação, no escuro sem agitação, no claro com agitação e no escuro com agitação. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

No crescimento de C.e.A6.F4.c.b, o meio Batata Dextrose (BD) foi quem proporcionou a maior produção de biomassa, havendo uma diferença significativa a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey, entre esse meio e os demais (Figura 43). O meio Batata Sacarose (BS) foi quem proporcionou a segunda maior produção de biomassa fúngica, seguido do meio Caldo de Batata-Doce (CBD), havendo diferença significativa entre eles. O meio Caldo de Cenoura (CC) foi quem proporcionou a menor produção de biomassa, mas não houve diferença significativa entre CC e o meio Batata Cenoura (BC).

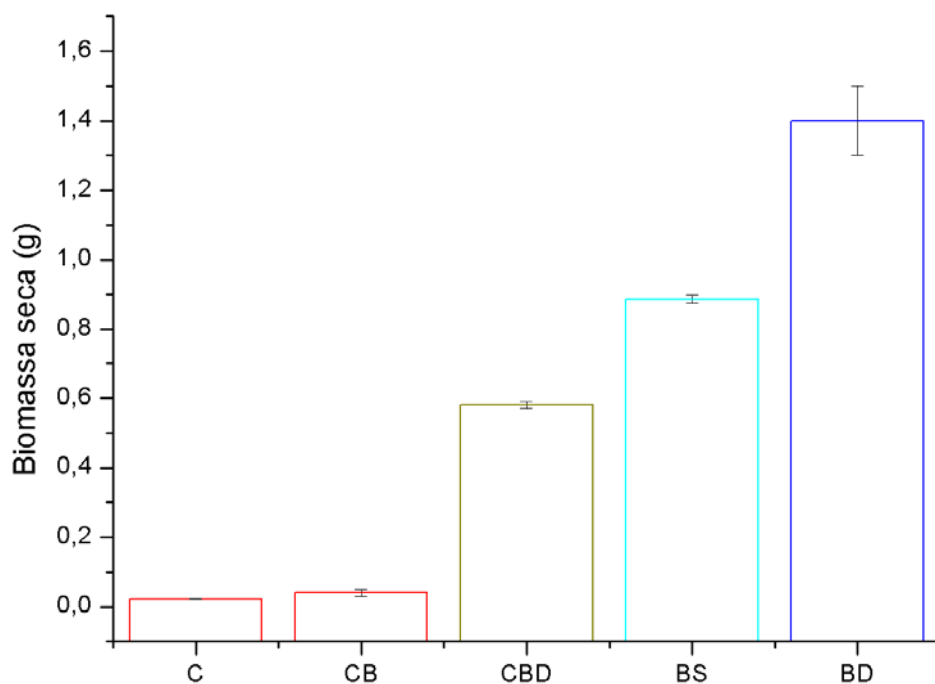


Figura 43. Produção de biomassa fúngica de C.e.A6.F4.c.b, nos diferentes meios de cultivo: Caldo de Cenoura, Batata Cenoura, Caldo de Batata Doce, Batata Sacarose e Batata Dextrose. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

O fungo C.e.A6.F4.c.b apresentou uma maior massa fúngica, no meio BD ao crescer no escuro, sem agitação, mas o aspecto macroscópico da colônia foi semelhante em ambos cultivos (Figura 44).

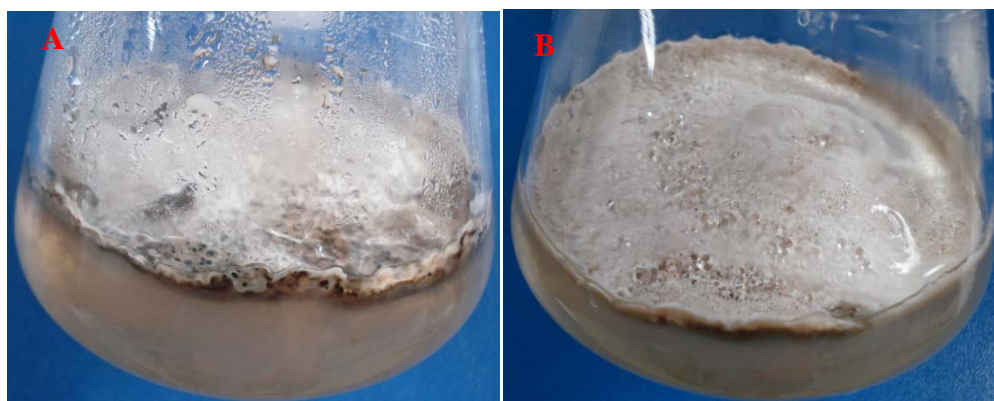


Figura 44. C.e.A6.F4.c.b após trinta dias crescimento em meio BD, a temperatura de 28° C, no claro (A) e no escuro (B), sem agitação.

Porém, não houve diferença significativa a nível de 5% de acordo com o teste de Tukey, entre as massas fúngicas produzidas no escuro, com agitação e sem agitação (Figura

45). Não houve diferença significativa no crescimento de *C.e.A6.F4.c.b*, no claro com agitação e no claro sem agitação.

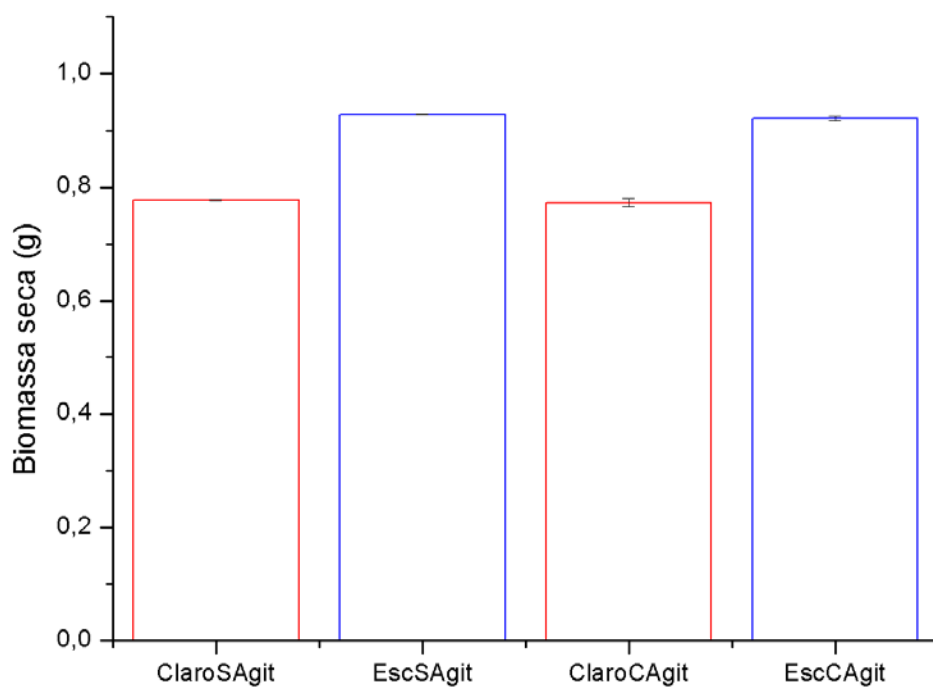


Figura 45. Produção de biomassa fúngica de *C.e.A6.F4.c.b*, no meio BD, nas diferentes condições ambientais: no claro sem agitação, no escuro sem agitação, no claro com agitação e no escuro com agitação. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

O crescimento de *Pestalotiopsis* sp., no meio BD, no claro e sem agitação proporcionou uma maior produção de biomassa (Figura 46-A).

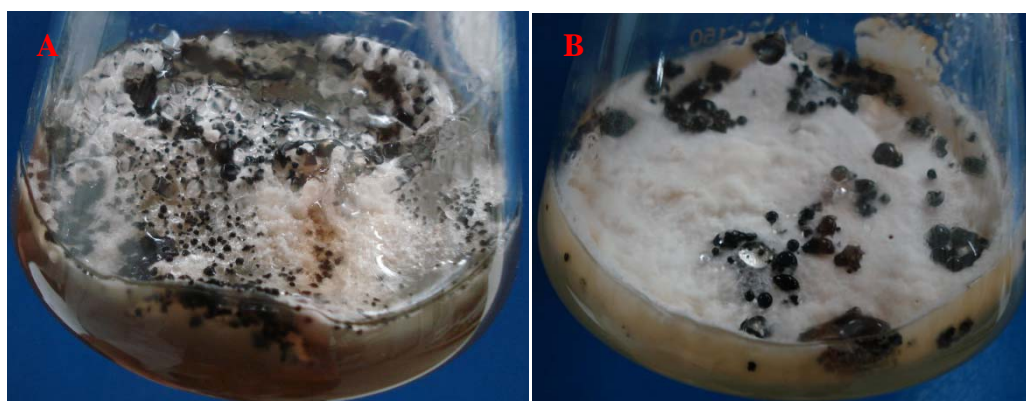


Figura 46. *Pestalotiopsis* sp. após trinta dias crescimento em meio BD, a temperatura de 28° C, no claro (A) e no escuro (B), sem agitação.

A nível de 5% de acordo com o teste de Tukey, houve diferença significativa na produção de biomassa de *Pestalotiopsis* sp. entre os meios que cresceram no claro em relação aos que cresceram no escuro (Figura 47).

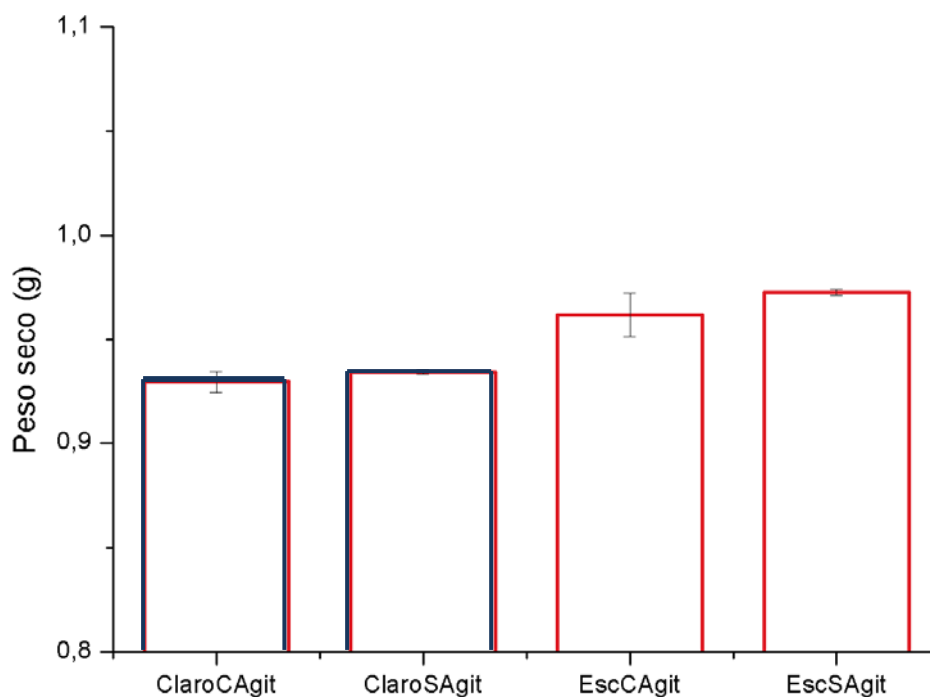


Figura 47. Produção de biomassa fúngica de *Pestalotiopsis* sp., no meio BD, nas diferentes condições ambientais: no claro com agitação, claro sem agitação, no escuro com agitação e no escuro sem agitação. Barras da mesma cor não diferem entre si, em nível de significância a 5% de acordo com o teste de Tukey, em ANOVA.

Após o cultivo em meio BD, durante 30 dias, no claro, sem aeração, a uma temperatura de 28° C, foram obtidos rendimentos diferentes dos isolados *B. rhodina*, *Xylaria* sp., C.e.A6.F4.c.b e *Pestalotiopsis* sp. Para cada 100 mL de meio de cultivo obteve-se aproximadamente 0,53 g, 0,74 g, 0,92 g e 0,97 g de massa fúngica, respectivamente de *B. rhodina*, *Xylaria* sp., C.e.A6.F4.c.b e *Pestalotiopsis* sp.

De *B. rhodina* obteve-se as seguintes quantidades de extratos: 2,899 g de n-hexano, 0,946 g de clorofórmio, 0,8627 g de acetato de etila e 2,9804 g de metanol. A soma do peso dos extratos apresentou um rendimento de 13,12% do peso total do micélio seco (Tabela 13).

TABELA 13. Rendimento dos extratos em relação à massa seca do micélio de *Botryosphaeria rhodina*.

Isolado	Solvente	Peso seco (g)	Rendimento (%)
<i>Botryosphaeria rhodina</i> 58,53g	Hexano	2,899 g	4,95
	Clorofórmio	0,946 g	1,61
	Acetato de etila	0,862 g	1,47
	Metanol	2,980 g	5,09
			Total 13,12

As quantidades de extratos obtidas de *Xylaria* sp. foram as seguintes: 0,087 g de n-hexano, 0,063 g de clorofórmio, 0,204 g de acetato de etila e 0,712 g de metanol. A partir da soma dos pesos dos extratos, obteve-se um rendimento de 7,13% do peso total do micélio seco de *Xylaria* sp. (Tabela 14).

TABELA 14. Rendimento dos extratos em relação à massa seca do micélio de *Xylaria* sp.

Isolado	Solvente	Peso seco (g)	Rendimento (%)
<i>Xylaria</i> sp. 14,91g	Hexano	0,087 g	0,58
	Clorofórmio	0,063 g	0,42
	Acetato de etila	0,204 g	1,36
	Metanol	0,712 g	4,77
			Total 7,13

De C.e.A6.F4.c.b. obteve-se as seguintes quantidades de extratos: 2,753 g de n-hexano e 0,518 g de clorofórmio. A soma do peso dos extratos apresentou um rendimento de % do peso total do micélio seco (Tabela 15).

TABELA 15. Rendimento dos extratos em relação à massa seca do micélio de C.e.A6.F4.c.b.

Isolado	Solvente	Peso seco (g)	Rendimento (%)
C.e.A6.F4.c.b. 12,08 g	Hexano	2,753 g	22,8
	Clorofórmio	0,518 g	4,3
			Total 27,1

A partir da massa fúngica de *Pestalotiopsis* sp. obteve-se as seguintes quantidades de extratos: 1,28 g de n-hexano e 0,37 g de clorofórmio. A soma do peso dos extratos apresentou um rendimento de % do peso total do micélio seco (Tabela 16).

TABELA 16. Rendimento dos extratos em relação à massa seca do micélio de *Pestalotiopsis* sp.

Isolado	Solvente	Peso seco (g)	Rendimento (%)
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Hexano	1,28 g	2,2
57,90 g	Clorofórmio	0,37 g	0,64
			Total 2,84

Na avaliação da atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*, nenhum dos extratos foi ativo (Figura 48), na concentração de 50 mg/mL. Apenas o controle positivo, o antibiótico norfloxacina exibiu um halo de inibição no crescimento da bactéria.

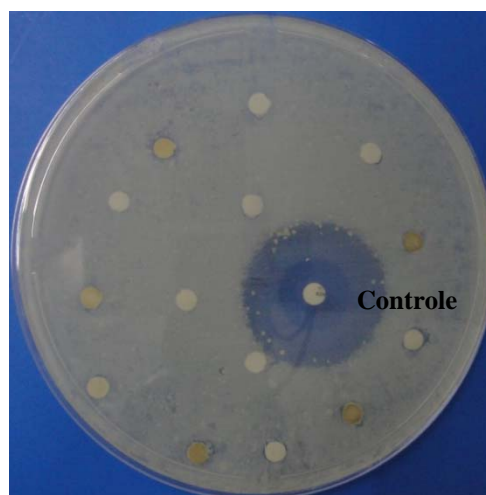


Figura 48. Os discos contendo extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos de *C. echinata* não apresentaram atividade, na presença de *Enterococcus faecalis*.

Enterococcus faecalis já teve o seu crescimento inibido por extratos de fungos endofíticos, a exemplo de isolados de orquídeas do gênero *Barlia* que apresentaram amplo espectro antimicrobiano, inclusive contra *E. faecalis* (Scrugli et al., 2000). Do endofítico *Ampelomyces* sp., de catorze compostos produzidos, doze foram ativos contra *E. faecalis* (Aly et al., 2008).

Nos testes frente à bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* nenhum dos extratos, obtidos dos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* apresentou atividade, apenas o antibiótico norfloxacina promoveu a formação de halo de inibição (Figura 49).

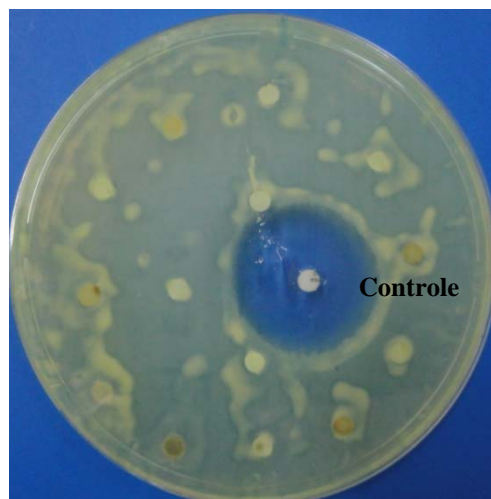


Figura 49. Os discos contendo os extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos de *C. echinata* não apresentaram atividade, na presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

Alguns estudos têm demonstrado a eficiência de fungos endofíticos na inibição do crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, dentre esses podemos citar o trabalho de Pinto (2003) que isolou vinte e quatro fungos endofíticos, da planta rabo-de-raposa, dos quais dez apresentaram atividade contra *P. aeruginosa*. Três extratos isolados do fungo endofítico *Phomopsis* sp. inibiram o crescimento de *P. aeruginosa* (Corrado; Rodrigues, 2004). No estudo desenvolvido por Maria et al. (2005), *Pestalotiopsis* sp. isolado de duas espécies de plantas do manguezal, demonstrou inibição frente à *P. aeruginosa* e à *Staphylococcus aureus*. Mas, no presente estudo os extratos produzidos pelo mesmo gênero não demonstraram nenhum efeito inibitório.

Os extratos não apresentaram nenhum efeito inibitório frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, diferentemente do controle positivo (Figura 50) que produziu halos de inibição nos testes em triplicata.



Figura 50. Os discos contendo os extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos de *C. echinata* não apresentaram atividade, na presença de *Staphylococcus aureus*.

A bactéria *Staphylococcus aureus* tem sido inibida em diversos testes realizados, utilizando extratos obtidos de fungos endofíticos. Diferentemente dos resultados deste trabalho, os extratos de *Botryosphaeria* sp. inibiram o crescimento de *S. aureus* no estudo desenvolvido por Phongpaichit et al. (2006). Uma espécie desse mesmo gênero, o endofítico *Botryosphaeria mamane* produziu o composto primina que foi bastante ativo contra *Staphylococcus aureus* (Pongcharoen et al., 2007). O isolado endofítico *Colletotrichum* sp., obtido da planta medicinal *Artemisia annua* L., produziu metabólitos secundários que apresentaram atividade contra *S. aureus* (Lu et al., 2000). Esse mesmo fungo, isolado de outra planta medicinal, *Artemisia mongolica* Fisch. ex Besser, também apresentou atividade frente a essa bactéria (Zou et al., 2000). Da planta medicinal *Spondia mombin* foi isolado o fungo endofítico *Guignardia* sp., cujos extratos inibiram o crescimento de *S. aureus* (Rodrigues et al., 2000). Compostos obtidos do fungo endofítico *Hypocrea* sp. também foram ativos contra *S. aureus* (Gogoi et al., 2008).

O fato dos extratos obtidos dos endofíticos *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria* sp., *Pestalotiopsis* sp. e C.e.A6.F4.c.b. não apresentarem efeito inibitório pode estar relacionado à maneira como foi feito o processo de extração. Os extratos não foram obtidos a partir do filtrado do cultivo, e sim da massa fúngica. Além disso, a concentração dos extratos que foram impregnados nos discos de papel de filtro pode ter sido baixa, o que justifica a realização de novos testes em maiores concentrações dos extratos, e estes devem ser obtidos a partir do filtrado fúngico.

6.4. Conclusões

Diante dos resultados observados e nas condições em que foi conduzido o presente estudo, pode-se concluir que:

- *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex*, *Pestalotiopsis* sp. e C.e.A6.F4.c.b. apresentaram uma quantidade maior de massa fúngica ao crescerem no meio BD, no escuro, sem agitação.

- Os extratos dos fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata*, obtidos a partir de diferentes solventes, não exerceram efeito antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, não demonstrando capacidade em inibir o crescimento das amostras, nas concentrações utilizadas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico de fitopatógenos pode ser um mecanismo eficiente, utilizando microrganismos antagonicos. Entretanto, existem lacunas a serem preenchidas através de outras pesquisas, para encontrar os antagonicos ideais, ou seja, que se adaptem ao ambiente no qual serão introduzidos e que não possam ocasionar algum tipo de doença na planta hospedeira, uma vez que endofíticos de determinadas espécies vegetais podem comportar-se como patógenos em outras espécies.

Para que esses microrganismos possam ser recomendados em técnicas de controle de doenças em plantas, faz-se necessário a condução de diversos experimentos controlados em viveiros e posterior experimentação em condições de campo.

Há perspectivas de futuramente serem feitos testes com os extratos dos endofíticos isolados de *Caesalpinia echinata* Lam., porém em maiores concentrações. Também poderão ser feitos testes com extratos obtidos a partir do filtrado do cultivo desses endofíticos. E caso os testes demonstrem resultados positivos, será feito o isolamento e a identificação dos compostos presentes nesses extratos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, F. F. A.; Barbosa, J. M. Estudo de conservação e longevidade de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Ecossistema**, **10**: 145-150, 1985.

Aguiar, F. F. A.; Kanashiro, S.; Tavares, A. R.; Pinto, M. M.; Stancato, G. C.; Aguiar, J. de; Nascimento, do T. D. R. Germinação de sementes e formação de mudas de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil): efeito de sombreamento. **Revista Árvore**, **29** (6): 871-875, 2005.

Akello, J. et al. Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. **Crop Protection**, **xxx**: 1–5, 2008.

Albuquerque, É. D. **Isolamento, indentificação morfológica de endofítico de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Análise química e bioatividade de seus extratos.** Rio Largo, 2007. 77p. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Alagoas.

Almeida, C. V. de; Yara, R.; Almeida, M. de. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **40** (5): 467-470, 2005.

Aly, A. H. et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, **69**: 1716–1725, 2008.

Ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=../natural/index.html&conteúdo=... Acessado em: 31/10/2006.

Amorim, E. P. R.; Melo, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **24** (2): 565-568, 2002.

Andrews, J. A. Biological control in the phyllosphere: realistic goal or false hope? **Canadian Journal of Plant Pathology**, **12**: 300-307, 1992.

Anesini C, Perez C. Screening of plants used in argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology** **39** (2): 119-128, 1993.

Applied Biosystems. Performing DNA sequencing reactions, Section 3, p.2-6. In: Automated DNA Sequencing – Chemistry Guide, 2000.

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.

Azevedo, J. L. Biodiversidade Microbiana e Potencial Biotecnológico. In: **Ecologia Microbiana**. Eds. MELO, I.S. e AZEVEDO, J.L. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.445-461, 1998.

Azevedo, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, **22** (2): 225-229, 1999.

Azevedo, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB: Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 15 April 2000, vol.3, n.1 [cited 20 April 2000]. Available on the Web: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4>>. ISSN: 0717-3458.

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.

Bailey, B. A. et al. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, **46**: 24–35, 2008.

Barbedo, C. J.; Bilia, D. A. C.; Figueiredo-Ribeiro, R. de C. L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, **25** (4): 431-439, 2002.

Barbosa, C. C. et al. Crescimento de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **37** (6): 821-829, 2002.

Barbosa, M. A. G. et al. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, **32**: 98-104, 2001.

Bayman, P. et al. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytologist Journal**, **135**: 143-149, 1997.

Bayman, P. et al. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, **102** (8): 944–948, 1998.

Blackwell, W. H. Significant Medical Plants. In: **Poisonous and Medical Plants**. Ed. BLACKWELL, W.H. New Jersey: Prentice Hall Advanced, p. 265-267, 1990.

Benhamou, N.; Kloepper, J. W.; Tuzun, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, **204**: 153-168, 1998.

Benítez, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, **7**: 249-260, 2004).

Bent, E.; Chanway, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, **44**: 980-988, 1998.

Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo, v.1. Agronômica Ceres. 1995. 919p.

Bettiol, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 226 p.

Bettucci, L.; Alonso, R. A. Comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. **Mycological Research**, 101: 1060-1064, 1997.

Bettucci, L.; Saravay, M. Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: A preliminary study. **Mycological Research**, 97: 679-682, 1993.

Bettucci, L.; Alonso, R.; Tiscornia, S. Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. **Mycological Research**, 103: 468-472, 1999.

Bills, G. et al. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes**, 2: 165-194, 2002.

Blanco, C. G. **Guignardia citricarpa** Kiely: **Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**. Piracicaba, 1999. 200p. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo.

Boddey, R. M.; Urquiaga, S.; Reis, V.; Dobereiner, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plante and Soil**, 137: 111-117, 1991.

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**, 17 (5): 929-934, 2006.

Brady, S. F.; Clardy, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, 63 (10): 1447-1448, 2000.

Brasil. Portaria n. 006/92-N, 15 de janeiro de 1992. Lista Oficial de Espécies da Flora brasileira Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Brasil. 1992.

Bugbee, W. M.; Cole, D. F.; Nielsen, G. Microflora and invert sugar in juice from healthy tissue of sugarbeets. **Applied Microbiology**, 29: 780-781, 1975.

Bulbovas, P.; Rinaldi, M. C. S.; Delitti, W. B. C.; Domingos, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, 28 (4): 687-696, 2005.

Bussaban, B. et al. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, 47: 943-948, 2001.

Cafêu, M. C.; Silva, G. H. Teles, H. L.; Bolzani, V. da S.; Araújo, A. R. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, 28 (6): 991-995, 2005.

- Calistru, C.; McLean, M.; Berjak, P. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. **Mycopathologia**, **137**: 115-124, 1997.
- Camatti-Sartori, V. et al. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchard subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, **45** (5): 397-402, 2005.
- Cardoso, G. D. et al. Etiologia e progresso da mancha de pestalotia do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **25** (2): 335-336, 2003.
- Carrol, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, **69**: 2-9, 1988.
- Castillo, U. et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, **224**: 183-190, 2003.
- Castro, F. E.; Ponte, J. J. da. Resistência em mandioca, *Manihot esculenta*, à podridão-seca das manivas. **Fitopatologia Brasileira**, **4** (1):100, 1977.
- Chen, C.; Bauske, E. M.; Musson, R.; Rodriguezkabana, R.; Klopper, J. W. Biological Control of *Fusarium* wilt on Cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, **5**: 83-91, 1995.
- Childs, J. F. L.; Kopp, L. E.; Johnson, R. E. A species of *Physoderma* present in citrus and related species. **Phytopathology**, **55**: 681-687, 1965.
- Chomcheon, P. et al. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. **Phytochemistry**, **70**: 407-413, 2009.
- Coelho, A. R. et al. *Penicillium expansum* versus Antagonist Yeasts and Patulin Degradation *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **50** (4): 725-733, 2007.
- Corrado, M.; Rodrigues, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, **44** (2): 157-160, 2004.
- Corrêa, M. P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**: Rio de Janeiro, vol. 5. 1984.
- Cúndom, M. A.; Mazza, S. M.; Gutiérrez, S. A. Short communication. Selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, **1** (4): 79-82, 2003.
- Daisy, B. H. et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, **148**: 3737-3741, 2002.
- Dantas, S. A. F. et al. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na central de abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, **28** (5): 528-533, 2003.

Davison, E.M.; Tay, F.C.S. Twig, branch and upper trunk cankers of *Eucalyptus marginata*. **Plant disease**, **67**: 1285-1287, 1983.

Del Sal, G., Manfioletti, G.; Schneider, C. A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. **Nucleic Acids Research**, **16**: 9878-9878, 1988.

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 & Biotechnology**, **16**: 383-386, 2000.

Dias, M.S.C.; Costa, H.; Canuto, R.S. Manejo de doenças do morangueiro. **Informe Agropecuário**. Morango: conquistando novas fronteiras, Belo Horizonte, 28 (236): 64-77, 2007.

Ding, G. et al. Antifungal Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis foedan*. **Journal of Natural Products**, **71** (4): 615-618, 2008.

Dong, Z.; Canny, M. J.; McCully, M. E.; Roboredo, M. R.; Cabadilla, C. F.; Ortega, E.; Rodes, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugar cane stems: a new role for the apoplast. **Plant Physiology**, **105**: 1139-1147, 1994.

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**, **135**: 325-334, 1997.

Edginton, L. V.; Knew, K. L.; Barron, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phitopathology**, **62** (7): 42-44, 1971.

Esposito, E.; Azevedo, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educus, 2004. 510p.

Ethur, L. Z.; Cembranel, C. Z.; Silva, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, **31** (5): 885-887, 2001.

Ethur, L.Z. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, **30**:127-133, 2005.

Ezra, D.; Hess, W. M.; Strobel, G. A. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. **Microbiology**, **150**: 4023–4031, 2004a.

Ezra, D. et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, **150**: 785–793, 2004b.

Fahey, J. W.; Dimock, M. B.; Tomasino, S. F.; Taylor, J. M.; Carlson, P. S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: A case study in industry. *In: Microbial Ecology of Leaves*, p.401-411, 1991. Springer –Verlag, New York.

Fisher, P. J.; Petrini, O.; Scott, H. M. L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, **122**: 299-305, 1992.

Freire, F. C. O. et al. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 6p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico on line, 91). 2004.

Freire, F. C. O.; Barguil, B. M. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de carnaubeira no Brasil. **Summa phytopathologica**, **35**(1): 68, 2009.

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**, **96**: 928-936, 1991.

Fulzele, D. P. ; Heble, M. R. Large-scale cultivation of *Catharanthus roseus* cells: Production of ajmalicine in a 20-l airlift bioreactor. **Journal of Biotechnology**, **35**: 1-7, 1994.

Gallo, M. B. C. et al. Atividade citotóxica de extratos de fungos endofíticos isolados de *Smallanthus sonchifolius*. **Revista Brasileira de Biociências**, **5** (2): 402-404, 2007.

Gamboa, M. A.; Bayman, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, **33**(2): 352–360. 2001.

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**, **24** (5): 717-724, 2008.

Gangadevi, V.; Murugan, M.; Muthumary, J. Taxol determination from *Pestalotiopsis pauciseta*, a fungal endophyte of a medicinal plant. **Chinese Journal of Biotechnology**, **24** (8): 1433-1438, 2008.

Gao, X. et al. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**, **249**: 255–266, 2005.

Gardner, J. M.; FELDMAN, A.W.; Zablotowicz, M. Identity and Behavior of Xylem-Residing Bacteria in rough Lemon roots of Florida Citrus Trees. **Applied and Environmental Microbiology**, **43**: 1335-1342, 1982.

Ge, H. M. et al. Penicidones A–C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, **69**: 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**, **7** (2): 189-194, 2008.

Glienke, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

Gogoi, D. K. et al. Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. **Journal de Mycologie Médicale**, **18**: 1-9, 2008.

Gomes, N. S. B.; Junior, A. G.; Auer, C. G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**, **43**: 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**, **8** (5): 731-736, 2009.

Goodfellow, M.; Williams, S.T.; Mordarski, M. Introduction to the Importance of Actinomycetes. In: **The Biology of Actinomycetes**. Eds. Goodfellow, M.; Williams, S.T.; Mordarski, M. London: Academic Press, p. 1-6, 1984.

Guimarães, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. Ribeirão Preto, 2006. 208p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Guo, B.; Li, H.; Zhang, L.; Ziran, K. Six strains of endogenous fungi were isolated from the phloem (inner bark) of *Catharanthus roseus* in Wishan, Yunnan Provi. **Zhongcaoyao**, **20**: 214-215, 1998. Apud: Chemical Abstract CD-ROM. Produzido American Chemical Society.

Guo, B. et al. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. **Journal of Natural Products**, **63**: 602-604, 2000.

Gupta, R.; Saxena, R. K.; Chaturverde, P.; Viridi, J.S. Chitinase production by *Streptomyces viridans*: its potencial in fungal cell wall lysis. **Journal of Applied Bacteriology**, **78**: 378-383, 1995.

Haapalainen, M. L.; Kobets, N.; Piruzian, E.; Metzler, M. C. Integrative vetor for stable transformation and expression of a beta-1,3-glucanase gene in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **FEMS Microbiology Letters**, **162**: 1-7, 1998.

Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W. F.; Kloepper, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, **43**: 895-914, 1997.

Hanada, R. E. **Controle de *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão-parda dos frutos de cacauero com fungos endofíticos**. Amazonas, 2006. 101p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas.

Harper, J. K. et al. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, **59** (14): 2471-2476, 2003.

Hemken, R. W.; Jackson, J. A.; Boling, J. A. Toxic factors in tall fescue. **Journal Animal Science**, **58**: 1011-1016, 1984.

Horn, W. S. et al. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**, **51** (14): 3969-3978, 1995.

Huang, W. et al. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botany**, **61** (1): 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 fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **31**: 163-167, 2001.

Hussain et al. Bioactive chemical constituents of two endophytic fungi. **Biochemical Systematics and Ecology**, **35**: 898-900, 2007.

Inácio, M. L. et al. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandiocana* Nees (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, **34**: 822-824, 2006.

Isaka, M. et al. Phomoxanthenes A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal of Natural Products**, **64**: 1015-1018, 2001.

Jacobs, M. J.; Bugbee, W. M.; Gabrielson, D. A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, **63**: 1262-1265, 1985.

James, E. K.; Reis, V. M.; Olivares, F. L.; Baldani, J. I.; Dobereiner, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, **45**: 757-766, 1994.

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**, **70** (9): 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.

Kelman, A. (Ed.) Sourcebook of Laboratory Exercises in Plant Pathology. San Francisco and London, W. H. Freeman & Co. 1967.

Kern, M. E.; Blevins, K. S. **Micologia médica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, p. 256. 1999.

Kieran, P.M.; Macloughlin, P.F.; Malone, D.M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **Journal of Biotechnology**, 1-2 (59): 39-52, 1997.

Kimati, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 3ª ed. São Paulo, v. 2. Agronômica Ceres. 776p. 1997.

Kongsaeree, P. et al. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**, **66** (5): 709-711, 2003.

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

determination of absolute configuration by CD calculations. **Tetrahedron**, **57**: 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**, **28** (3): 251-257, 2003.

Küster, E.; Williams, S. T. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. **Nature**, **202**: 928-929, 1964.

Lampel, J. S. et al. Integrative cloning, expression, and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **60**: 501-508, 1994.

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

Lee, J. C. et al. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Journal of Organic Chemistry**, **61** (10): 3232-3233, 1996.

Li, E. et al. Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **16**: 7894-7899, 2008.

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

Li, J. Y. et al. The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. **Journal of Industrial Microbiology**, **20**: 259-264, 1998.

Li, J. Y. et al. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, **56**: 463-468, 2001.

Li, J. Y.; Strobel, G. A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, **57**: 261-265, 2001.

Li, Y. C.; T. W. Y. Interactions of Taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during Taxol accumulation. **Cell Biology International** **33**:106-112, 2009.

Lima, H. C. Aspectos botânicos do pau-brasil. In Viagem à terra do pau-brasil (M. W. Cunha & H. C. Lima, eds.). **Agência brasileira de Cultura**, Rio de Janeiro, p.23-38, 1992.

Lima, H. C.; Lewis, G. P.; Bueno, E. Pau-brasil: uma biografia. In Pau-brasil (E. Bueno, ed.). Axis Mundi Editora, São Paulo, p. 39-76, 2002.

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**, **1** (3): 119-126, 1995.

Lisboa, B. B. et al. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. *Ciência Rural*, **37** (5): 1255-1260, 2007.

Liu, C. H. et al. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, **88**: 277-282, 2001.

Liu et al. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, **114**: 279-287, 2004.

Liu, L. et al. Pestaloficiols A–E, bioactive cyclopropane derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**: 6021–6026, 2008.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2000.

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

Ma, Y. M. et al. Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia*, **75**: 451-456, 2004.

Machado, M. A. B. L. **Florística e fitossociologia do estrato arbóreo de fragmentos de Mata Atlântica da Usina Coruripe – Estado de Alagoas**. Rio Largo, 2003. 100p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas.

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.

Manieri, C. Estudo macro e microscópico de madeiras conhecidas por pau-brasil. **IPT**, São Paulo. Publicação 612. 1960.

Maria, G. L., Sridhar, K. R. e Raviraja, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, **1**: xx-xx. 2005.

Mariano, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, **I**: 369-409, 1993.

Marinho, A. M. do R. et al. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **16** (2): 280-283, 2005.

- Martins-Corder, M. P.; Melo, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Science agriculture**, **55**, n. 1, 1998.
- Martins, I. et al. Avaliação *in vitro* do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum Gloeosporioides*. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2007. 12p.
- McInroy, J.A.; Kloepper, J.W. Survel of Indigenous Bacteria endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, **173**: 337-342, 1995.
- Mejía, L. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control** **46**: 4-14, 2008.
- Mello, S. C. M. et al. Antagonistic process of *Dicyma pulvinata* against *Fusicladium macrosporum* on rubber tree. **Tropical Plant Pathology**, **33** (1): 5-11, 2008.
- Melo, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: **Controle Biológico**. Vol. 1, Eds. Melo, I. S. e Azevedo, J. L. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.17-67, 1998.
- Melo, I. S.; Azevedo, J. L. Controle Biológico. Jaguaraúna: **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**, **37**: 417-419, 2006.
- Mendes, M. de L.; Muchovej, J. J. *Pestalotiopsis* leaf spot of Brazil wood, *Caesalpinia echinata*. **Plant Pathology**, **40**: 635-636, 1991.
- Miyazaki Y. et al. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Journal Clin. Microbiology** **31**: 2228-2232, 1993.
- Montealegre, J. R. et al. Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional effect of solarization. **Journal of Biotechnology**, **8** (3): 250-257, 2005.
- Moreira, L. M. et al. Controle em pós colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, **27** (4): 395-398, 2002.
- Morilla, D. P. *Colletotrichum gloeosporioides* como endofítico de *Mirabilis jalapa* Linn: **determinação de fenóis totais e da atividade biológica e antioxidante dos seus extratos**. Maceió, 2009. 145p. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas.
- Moura, A. B.; Romeiro, R. S. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) **Ciência e Agrotecnologia**, **23** (2): 281-288, 1999.
- M'piga, P.; Bélanger, R. R.; Paulitz, T. C.; Benhamou, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, **50**: 301-320, 1997.

Mukhopadhyay, K. et al. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, **134**: 151-159, 1996.

Mundt, J.O.; Hinkle, N.F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, **32**: 694-698, 1976.

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**, **XXX**: 1-5, 2008.

Nascimento, C. B. do. Isolamento de microorganismos endofíticos da rizosfera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e análise da diversidade genética, antimicrobiana e celulolítica. **Revista de Biologia Neotropical**, **3** (2): 187-188, 2006.

NIH. NIAID global health research plan for HIV/AIDS, malaria and tuberculosis. US Department of Health and Human Services. Bethesda, Md. 2001.

Okami, Y.; Hotta, K. Search and discovery of new antibiotics. In: **Actinomyces in Biotechnology**. Eds. Goodfellow, M.; Williams, S.T.; Mordarski, M. London: Academic Press, p. 37-67, 1988.

Oliveira, L. F. C. de; Edwards, H. G. M.; Velozo, E. S.; Nesbitt, M. Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilin, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational Spectroscopy**, **28**: 243-249, 2002.

Pastre, R.; Marinho, A. M. R.; Rodrigues-Filho, E. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, **30** (8): 1867-1871, 2007.

Paul, E.A.; Clark, F. E. Components of the soil biota. In: **Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, p. 69-109, 1996.

Pelaéz et al. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, **102** (6) : 755-761, 1998.

Pereira, A. L.; Silva, G. S.; Ribeiro, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, **31**: 572-578, 2006.

Pereira, J. O.; Azevedo, J. L.; Petrini, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Micologia**, **85**: 362-364, 1993.

Pereira, J. O.; Vieira, M. L. C.; Azevedo, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **15**: 37-40, 1999.

Petrini, O.; Stone, K.; Carrol, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, **60**: 789-796, 1982.

- Petrini, O.; Müller, E. Research on Endophytic. **Swisser Biotechnology**, **4**: 8-10, 1986.
- Petrini, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J. & Hirano, S. S. eds. **Microbial ecology of leaves**. New York: Spring-Verlag, p.179-197, 1991.
- Phongpaichit, S. et al. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **48**: 367–372, 2006.
- Pileggi, M. et al. Ação antimicrobiana e interação endofítica em *Symphytum officinale* L. **Biological and Health Sciences**, **8** (1): 47-55, 2002.
- Pinto, L. D. **Atividade antimicrobiana e caracterização molecular de microrganismos e ndofíticos isolados de folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco)**. Recife, 2003. 75p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- Pleban. S.; Chernin, L.; Chet, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, **25**: 284-288, 1997.
- Pongcharoen, W. et al. A new dihydrobenzofuran derivative from the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **55** (9): 1404-1405, 2007.
- Ponte, J. J. da. et al. A podridão-seca-das-manivas da maniçoba, *Manihot glaziovii* Muell. Arg. **Fitopatologia Brasileira**, **7**: 51-54, 1982.
- Ponte, J. J. da. Uma nova doença da ateira (*Anona squamosa*) e da gravioleira (*Annona muricata*) causada por *Botryodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, **10**: 689-691, 1985.
- Ponte, J. J. da. **Clínica de doenças de plantas**. Fortaleza. EUFC. 872p. 1996.
- Prapagdee, B.; Kuekulvong, C.; Mongkolsuk, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Sciences**, **4** (5): 330-337, 2008.
- Qin, J. et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **19**: 1572–1574, 2009.
- Radhakrishnan, T. C.; Mammootty, K. P. Nodal rotting of pepper. **Indian Phytopathology**, **40** (1): 5-10, 1979.
- Ramalho, R. S. **Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 11 p. (Boletim de Extensão, 12). 1978.
- Ram, C. Epidemiologia e controle químico da “Queima das folhas” (*Lasiodiplodia theobromae*) cocos nucifera. **Fitopatologia Brasileira**, **14**: 215-220, 1998.

- 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.**, **13** (3): 31-36, 2007.
- Raven, P. H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 326-327, 2007.
- Rezende, C. M.; Corrêa, V. F. S.; Costa, A. V. M.; Castro, B. C. S. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). **Química Nova**, **27** (3): 414-416, 2004.
- Ribeiro, I. J. A. et al. Uma nova doença da videira (*Vitis vinifera*) causada por *Botryodiplodia theobromae*. **Summa Phytopathologica**, **18** (1): 30, 1992.
- Riker, A. J.; Riker, R. S. **Introduction to research on plant diseases**. St. Louis, Mo., John S. Swift Co. 1936.
- Rizzini, C. T. **Plantas do Brasil. Árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia brasileira**. São Paulo; Edgard Blucher. 118 p. 1978.
- 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** **40**:73-78, 2009.
- Rocha, Y. T. **Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade**. São Paulo, 2004. 457p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Rocha, Y. T. e Barbedo, A. S. C. Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) na arborização urbana de São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Recife (PE). **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, **3** (2): 58-77, 2008.
- Rodrigues, K. F.; Petrini, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: **Diversity of Tropical Microfungi**. Eds. Hyde, K.D. Hong Kong: University of Hong Kong Press, p. 57-69, 1997.
- Rodrigues, K. F.; Hesse, M.; Werner, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, **40** (4): 261-267, 2000.
- Rohlf, F. J. **NTSY-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York. Exeter Publishing. 1988.
- Rubini, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease. **International Journal of Biological Sciences**, **(1)**: 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**, **10**: 43-51, 2009.

Rukachaisirikul, V. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry**, **69**: 783–787, 2008.

Ruppel, S. et al. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, **145**: 261-273, 1992.

Saghai-Marooif, M. A. et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. **81**: 8014-8018, 1984.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular cloning - **A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.

Santos, L. S. et al. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta Daninha**, **26** (3): 539-548, 2008.

Santos, G. de B. L. ***Phomopsis* sp. Como endofítico de *Turnera subulata*: isolamento, identificação e atividade biológica de seus extratos**. 61 f. 2009. Dissertação. (Mestrado em Química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas.

Sardi, P. et al. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface, sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, **58**: 2691-2693, 1992.

Schultz, B. et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs; effectiveness of surface esterilization methods. **Mycological Research**, **97**: 1447-1450, 1993.

Schultze, A. E. et al. Alterations in bovine serum biochemistry profiles associated with prolonged consumption of endophyte-infected tall fescue. **Veterinary and Human Toxicology**: **41**: 133-139, 1999.

Schulz, B. et al. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, **99** (8): 1007-1015, 1995.

Schulz, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, **106** (9): 996-1004, 2002.

Schulz, B.; Boyle, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, **109** (6): 661-686, 2005.

Scrugli, A. et al. Attivita biologica di funghi di Orchidaceae spontanee della Sardegna. Biologic activity of endophytic fungi isolated from sardinian orchid roots. **Micologia Italiana**, **29** (2): 29-37, 2000.

Serra, I. M. R. S.; Coelho, R. S. B. Mancha de *Pestalotiopsis* em helicônia: caracterização da doença e potenciais fontes de resistência. **Fitopatologia Brasileira** **32**: 44-49, 2007.

Shearer, B.L.; Tippett, J.T.; Bartle, J.R. *Botryosphaeria ribis* infection associated with death of *Eucalyptus radiata* in species selection trials. **Plant disease**, **71**: 140-145, 1987.

- Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* Species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **16**: 313-340, 1966.
- Shrestha, K. et al. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of *Himalayan yew* of Nepal. **Planta Medicinal**, **67**: 374-376, 2001.
- Sikora, R. A. et al. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**, **46**: 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**, **29**: 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**, **16 (6B)**: 1463-1466, 2005.
- 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**, **20 (3)**: 649-655, 2006a.
- 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**, **3 (2)**: 181-182, 2006b.
- Silva, K. S. et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, **29 (4)**: 749-754, 2008.
- Singh, S. N. et al. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, **3 (76)**: 269-277, 2001.
- 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**, **80 (9)**: 880-885, 1990.
- Sneath, P. H.; Sokal, R. R. Numerical taxonomy. San Francisco: W.H. **Freeman and Company**, 573 p. 1973.
- Soares, C. M. C. **Pau-brasil: a árvore nacional**. 2ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco/Estação Ecológica de Tapacurá. 1985.
- Sousa, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC, p. 405-410, 1991.
- Souza Filho, B. F.; Santos, H. P.; Robbs, C. F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, **1**: 5-10, 1979.

Souza, A. O. **Bactérias endofíticas de milho (*Zea mays*) e sua variabilidade genética analisada por RAPD**. Piracicaba, 1996. 85p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.

Souza, A. Q. L. de et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, **34** (2): 185-195, 2004.

Stinson, M. et al. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, **165**: 913-922, 2003.

Stone, J. K. Foliar endophytes of *Pseudotsuga menziesii* (mirb) Franco. Cytology and physiology of the host-endophyte relationship. **Eugene**, 124p. (PhD). University of Oregon, 1986.

Stowe, B. B.; Yamaki, T. The history and physiological action of the gibberellins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, **8**: 181-216, 1957.

Strobel, G. A. et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, **142**: 435-440, 1996.

Strobel, G. A. et al. *Pestalotiopsis guelpinii*, a taxol-producing endophyte of the *Wollemi pine*, *Wollemia nobilis*. **Australian Journal of Botany**, **45**: 1073-1082, 1997.

Strobel, G. A. e Long, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society of Microbiology News**, **64**: 263-268, 1998.

Strobel, G. A. et al. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System. **Applied Microbiology**, **22**: 426-433, 1999a.

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

Strobel, G. A. et al. Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. **Microbiology**, **145**: 3557-3564, 1999c.

Strobel, G. A. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, **147**: 2943-2950, 2001.

Strobel, G. et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, **60**: 179-183, 2002.

Strobel, G. et al. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, **5**: 535-544, 2003.

Sturz, A. V.; Christie, B. R.; Matheson, B. G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, **44**: 162-167, 1998.

Sturz, A. V.; Christie, B. R.; Matheson, B. G.; Nowak, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, **25**: 13-19, 1997.

Suto, M. Takebayashi, M.; Saito, K.; Tanaka, M.; Yokota, A.; Tomita, F. Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **93** (1): 88-90, 2002.

Tan, R. X.; Zou, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, **18**: 448-459, 2001.

Tavares, S. C. C. H.; Menezes, M.; Choudhury, M. Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Lat. na região semi-árida de Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **13**: 163-166, 1991.

Tayung, K.; Jha, D. K. Antimicrobial evaluation of some fungal endophytes isolated from the bark of himalayan yew. **World Journal of Agricultural Sciences**, **2** (4): 489-494, 2006.

Tomasino, S. F. et al. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryIA(c)* of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control**, **5**: 442-448, 1995.

Tor, M.; Mantell, S. H.; Ainsworth, C. Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positive in transformation of *Discorea* species. **Plant Cell Reports**, **11**: 452-456, 1992.

Tikhomiroff, C.; Jolicœur, M. Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolites by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, **955**: 87-93, 2002.

Tuite, J. **Plant Pathological Methods**. Fungi and Bacteria. Minn., Burgess Publish. Co. 1969.

Uetanabaro, A. P. T. **Taxonomia e triagem da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos raros isolados de *Tocoyena formosa* (Cham. Et Sch) K. Schun.** Campinas, 2004. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Uratani, B. B.; Alcorn, S. C.; Tsang, B. H.; Kelly, J. L. Construction of secretion vectors and use of heterologous signal sequences for protein secretion in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, **8**: 892-898, 1995.

Viana, F. M. P. et al. Podridão-basal-pós-colheita do coco anão verde no Estado do Ceará. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 10. 2001.

Viana, F. M. P. et al. Fungos associados a frutos e sementes do sapatizeiro. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado Técnico, 59. 2003.

Vieira, J. de O. **Isolamento de *Pestalotiopsis* sp. causador de mancha foliar em *Caesalpinia echinata* Lam. Testes de antagonismo frente aos fitopatógenos *Pythium debarianum* e *Phytophthora palmivora*.** 30 f. 2008. Monografia de TCC. Universidade Federal de Alagoas.

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. et al. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **34**: 51-57, 2002.

Warwick, D. R. N.; Bezerra, A. P. O.; Renard, J. L. Reaction of coconut hybrids to leaf blight (*Lasiodiplodia theobromae* Pat). Field observations. **Oléagineux**, **46**: 100-108, 1991.

Weber, R. W. S. et al. Anti-Candida metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, **68**: 886–892, 2007.

White, T. J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. p. 315-322. In M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York, Academic Press, 482 p. 1990.

Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J. A. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, **218**: 704-740, 1993.

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**, **20**: 265–272, 2004.

Yang, X. et al. Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, **35** (1): 79-81, 2004.

Yin, H. et al. Gentiopicrotin-producing endophytic fungus isolated from *Gentiana macrophylla*. **Phytomedicine** (2009), doi:10.1016/j.phymed.2008.12.009.

Zhang, L. et al. Isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic. **Zhongcaoyao**, **31**: 805-807, 2000. Apud: Chemical Abstract CD-ROM. Produzido American Chemical Society, 2001.

Zou, W. X. et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, **63**: 1529-1530, 2000.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Análise estatística do crescimento do fungo endofítico *Botryosphaeria rhodina*, em diferentes meios de cultivo.

ANOVAOneWay (14-09-2009 10:48:13)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
CB	3	0,033	1E-3	5,7735E-4
C	3	0,04733	5,7735E-4	3,33333E-4
CBD	3	0,34333	0,00577	0,00333
BD	3	0,4	0,01	0,00577
BS	3	0,31	0,01	0,00577

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	0,3608	0,0902	1921,88352	2,22045E-14
Error	10	4,69333E-4	4,69333E-5		
Total	14	0,36127			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,9987	0,03022	0,00685	0,22673

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
C CB	0,01433	0,00559	3,62382	0,15187	0,05	0	-0,00408	0,03274
CBD CB	0,31033	0,00559	78,46001	0	0,05	1	0,29192	0,32874
CBD C	0,296	0,00559	74,83618	0	0,05	1	0,27759	0,31441
BD CB	0,367	0,00559	92,78676	0	0,05	1	0,34859	0,38541
BD C	0,35267	0,00559	89,16293	0	0,05	1	0,33426	0,37108
BD CBD	0,05667	0,00559	14,32675	1,08818E-5	0,05	1	0,03826	0,07508
BS CB	0,277	0,00559	70,03251	0	0,05	1	0,25859	0,29541
BS C	0,26267	0,00559	66,40869	0	0,05	1	0,24426	0,28108
BS CBD	-0,03333	0,00559	8,4275	0,00102	0,05	1	-0,05174	-0,01492
BS BD	-0,09	0,00559	22,75425	4,14245E-8	0,05	1	-0,10841	-0,07159

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	1,13778E-4	2,84444E-5	2,01047	0,16889
Error	10	1,41481E-4	1,41481E-5		

At the 0.05 level, the population variations are not significantly different.

ANEXO 2. Análise estatística do crescimento do fungo endofítico *Botryosphaeria rhodina*, no meio BD, em diferentes tratamentos.

ANOVAOneWay (26-08-2009 10:55:54)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
ClaroSAgit	3	0,451	1E-3	5,7735E-4
EscSAgit	3	0,531	1E-3	5,7735E-4
ClaroCAgit	3	0,44567	0,00404	0,00233
EscCAgit	3	0,52933	5,7735E-4	3,33333E-4

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	0,02014	0,00671	1438,35119	2,88387E-11
Error	8	3,73333E-5	4,66667E-6		
Total	11	0,02017			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99815	0,00442	0,00216	0,48925

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
EscSAgit ClaroSAgit	0,08	0,00176	64,1427	0	0,05	1	0,07435	0,08565
ClaroCAgit ClaroSAgit	-0,00533	0,00176	4,27618	0,06432	0,05	0	-0,01098	3,15084E-4
ClaroCAgit EscSAgit	-0,08533	0,00176	68,41888	0	0,05	1	-0,09098	-0,07968
EscCAgit ClaroSAgit	0,07833	0,00176	62,80639	0	0,05	1	0,07268	0,08398
EscCAgit EscSAgit	-0,00167	0,00176	1,33631	0,78268	0,05	0	-0,00732	0,00398
EscCAgit ClaroCAgit	0,08367	0,00176	67,08257	0	0,05	1	0,07802	0,08932

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	1,43704E-5	4,79012E-6	7,60784	0,00994
Error	8	5,03704E-6	6,2963E-7		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

ANEXO 3. Análise estatística do crescimento do fungo endófito C.e.A6.F4.c.b., em diferentes meios de cultivo.

ANOVAOneWay (01-09-2009 18:24:59)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
CB	3	0,04	0,01	0,00577
C	3	0,02267	0,00153	8,81917E-4
CBD	3	0,58	0,01	0,00577
BD	3	1,4	0,1	0,05774
BS	3	0,88667	0,01155	0,00667

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	4,10548	1,02637	496,51833	1,88561E-11
Error	10	0,02067	0,00207		
Total	14	4,12615			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99499	0,0776	0,04547	0,58587

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
C CB	-0,01733	0,03712	0,66033	0,98876	0,05	0	-0,13951	0,10484
CBD CB	0,54	0,03712	20,5717	3,77784E-7	0,05	1	0,41783	0,66217
CBD C	0,55733	0,03712	21,23202	2,84486E-7	0,05	1	0,43516	0,67951
BD CB	1,36	0,03712	51,8102	0	0,05	1	1,23783	1,48217
BD C	1,37733	0,03712	52,47053	0	0,05	1	1,25516	1,49951
BD CBD	0,82	0,03712	31,2385	0	0,05	1	0,69783	0,94217
BS CB	0,84667	0,03712	32,25439	0	0,05	1	0,72449	0,96884
BS C	0,864	0,03712	32,91472	0	0,05	1	0,74183	0,98617
BS CBD	0,30667	0,03712	11,68269	6,75744E-5	0,05	1	0,18449	0,42884
BS BD	-0,51333	0,03712	19,55581	5,46159E-7	0,05	1	-0,63551	-0,39116

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

ANEXO 4. Análise estatística do crescimento do fungo endofítico *Xylaria* sp., em diferentes meios de cultivo.

ANOVAOneWay (08-09-2009 18:40:03)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
CB	3	0,01	0	0
C	3	0,033	1E-3	5,7735E-4
CBD	3	0,74	0,01	0,00577
BS	3	0,77	0,01	0,00577
BD	3	0,89333	0,00577	0,00333

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	2,22847	0,55712	11887,29872	0
Error	10	4,68667E-4	4,68667E-5		
Total	14	2,22894			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99979	0,01399	0,00685	0,48927

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
C CB	0,023	0,00559	5,81911	0,01403	0,05	1	0,0046	0,0414
CBD CB	0,73	0,00559	184,69343	0	0,05	1	0,7116	0,7484
CBD C	0,707	0,00559	178,87433	0	0,05	1	0,6886	0,7254
BS CB	0,76	0,00559	192,28357	0	0,05	1	0,7416	0,7784
BS C	0,737	0,00559	186,46447	0	0,05	1	0,7186	0,7554
BS CBD	0,03	0,00559	7,59014	0,00227	0,05	1	0,0116	0,0484
BD CB	0,88333	0,00559	223,48749	0	0,05	1	0,86494	0,90173
BD C	0,86033	0,00559	217,66838	0	0,05	1	0,84194	0,87873
BD CBD	0,15333	0,00559	38,79405	0	0,05	1	0,13494	0,17173
BD BS	0,12333	0,00559	31,20391	0	0,05	1	0,10494	0,14173

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	1,23141E-4	3,07852E-5	2,17706	0,14519
Error	10	1,41407E-4	1,41407E-5		

At the 0.05 level, the population variations are not significantly different.

ANEXO 5. Análise estatística do crescimento do fungo endofítico *Pestalotiopsis* sp., no meio BD, em diferentes tratamentos.

ANOVAOneWay (25-08-2009 18:28:10)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
ClaroSAgit	3	0,934	1E-3	5,7735E-4
EscSAgit	3	0,97267	0,00153	8,81917E-4
ClaroCAgit	3	0,92933	0,00503	0,00291
EscCAgit	3	0,962	0,01039	0,006

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	0,00402	0,00134	39,21626	3,93975E-5
Error	8	2,73333E-4	3,41667E-5		
Total	11	0,00429			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,93633	0,00616	0,00585	0,9495

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
EscSAgit ClaroSAgit	0,03867	0,00477	11,45766	1,84939E-4	0,05	1	0,02338	0,05395
ClaroCAgit ClaroSAgit	-0,00467	0,00477	1,38282	0,76558	0,05	0	-0,01995	0,01062
ClaroCAgit EscSAgit	-0,04333	0,00477	12,84048	8,04913E-5	0,05	1	-0,05862	-0,02805
EscCAgit ClaroSAgit	0,028	0,00477	8,29693	0,00168	0,05	1	0,01272	0,04328
EscCAgit EscSAgit	-0,01067	0,00477	3,16073	0,19344	0,05	0	-0,02595	0,00462
EscCAgit ClaroCAgit	0,03267	0,00477	9,67975	5,99896E-4	0,05	1	0,01738	0,04795

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	1,0163E-4	3,38765E-5	7,06306	0,01226
Error	8	3,83704E-5	4,7963E-6		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

ANEXO 6. Análise estatística do antagonismo dos fungos endofíticos isolados de *Caesalpinia echinata* frente ao fitopatógeno *Pythium debaryanum*.

ANOVAOneWay (22-07-2009 16:04:51)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
B. rhodina	5	1,62	0,17889	0,08
CeA9f	5	3,4	0,18708	0,08367
CeAu1F1	5	2,3	0,07071	0,03162
CeAu2F3	5	2,72	0,10954	0,04899
CeAu2F4	5	2,4	0,07071	0,03162
PestaAU2	5	1,7	0,07071	0,03162
Pythium	5	3,56	0,11402	0,05099
Xylaria	5	1,78	0,43243	0,19339

One Way ANOVA

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
CeA9f B. rhodina	1,78	0,12124	20,76234	0	0,05	1	1,38725	2,17275
CeAu1F1 B. rhodina	0,68	0,12124	7,93168	8,4188E-5	0,05	1	0,28725	1,07275
CeAu1F1 CeA9f	-1,1	0,12124	12,83066	9,56665E-8	0,05	1	-1,49275	-0,70725
CeAu2F3 B. rhodina	1,1	0,12124	12,83066	9,56665E-8	0,05	1	0,70725	1,49275
CeAu2F3 CeA9f	-0,68	0,12124	7,93168	8,4188E-5	0,05	1	-1,07275	-0,28725
CeAu2F3 CeAu1F1	0,42	0,12124	4,89898	0,02927	0,05	1	0,02725	0,81275
CeAu2F4 B. rhodina	0,78	0,12124	9,0981	8,0304E-6	0,05	1	0,38725	1,17275
CeAu2F4 CeA9f	-1	0,12124	11,66424	1,50322E-7	0,05	1	-1,39275	-0,60725
CeAu2F4 CeAu1F1	0,1	0,12124	1,16642	0,99031	0,05	0	-0,29275	0,49275
CeAu2F4 CeAu2F3	-0,32	0,12124	3,73256	0,17919	0,05	0	-0,71275	0,07275
PestaAU2 B. rhodina	0,08	0,12124	0,93314	0,99751	0,05	0	-0,31275	0,47275
PestaAU2 CeA9f	-1,7	0,12124	19,8292	0	0,05	1	-2,09275	-1,30725
PestaAU2 CeAu1F1	-0,6	0,12124	6,99854	5,50162E-4	0,05	1	-0,99275	-0,20725
PestaAU2 CeAu2F3	-1,02	0,12124	11,89752	1,30021E-7	0,05	1	-1,41275	-0,62725
PestaAU2 CeAu2F4	-0,7	0,12124	8,16497	5,25463E-5	0,05	1	-1,09275	-0,30725
Pythium B. rhodina	1,94	0,12124	22,62862	7,74337E-9	0,05	1	1,54725	2,33275
Pythium CeA9f	0,16	0,12124	1,86628	0,88461	0,05	0	-0,23275	0,55275
Pythium CeAu1F1	1,26	0,12124	14,69694	0	0,05	1	0,86725	1,65275
Pythium CeAu2F3	0,84	0,12124	9,79796	2,0478E-6	0,05	1	0,44725	1,23275
Pythium CeAu2F4	1,16	0,12124	13,53051	8,69993E-8	0,05	1	0,76725	1,55275
Pythium PestaAU2	1,86	0,12124	21,69548	7,3096E-9	0,05	1	1,46725	2,25275
Xylaria B. rhodina	0,16	0,12124	1,86628	0,88461	0,05	0	-0,23275	0,55275
Xylaria CeA9f	-1,62	0,12124	18,89606	0	0,05	1	-2,01275	-1,22725
Xylaria CeAu1F1	-0,52	0,12124	6,0654	0,00344	0,05	1	-0,91275	-0,12725
Xylaria CeAu2F3	-0,94	0,12124	10,96438	3,00011E-7	0,05	1	-1,33275	-0,54725
Xylaria CeAu2F4	-0,62	0,12124	7,23183	3,44914E-4	0,05	1	-1,01275	-0,22725
Xylaria PestaAU2	0,08	0,12124	0,93314	0,99751	0,05	0	-0,31275	0,47275
Xylaria Pythium	-1,78	0,12124	20,76234	0	0,05	1	-2,17275	-1,38725

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.
Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	7	0,36316	0,05188	5,188	5,02676E-4
Error	32	0,32	0,01		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

ANEXO 7. Análise estatística do antagonismo dos fungos endofíticos isolados de *Caesalpinia echinata* frente ao fitopatógeno *Phytophthora palmivora*.

ANOVAOneWay (24-08-2009 11:40:32)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
CeAu2F4	5	1	0,07071	0,03162
Xylaria	5	1,24	0,16733	0,07483
B. rhodina	5	1,62	0,32711	0,14629
PestaAU2	5	1,8	0,07071	0,03162
CeA9f	5	3,4	0,15811	0,07071
Phytopal	5	4	0,12247	0,05477

One Way ANOVA

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,98074	0,08067	0,17559	2,17667

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Xylaria CeAu2F4	0,24	0,11106	3,05623	0,29165	0,05	0	-0,10338	0,58338
B. rhodina CeAu2F4	0,62	0,11106	7,89526	1,26441E-4	0,05	1	0,27662	0,96338
B. rhodina Xylaria	0,38	0,11106	4,83903	0,02408	0,05	1	0,03662	0,72338
PestaAU2 CeAu2F4	0,8	0,11106	10,18743	2,58581E-6	0,05	1	0,45662	1,14338
PestaAU2 Xylaria	0,56	0,11106	7,1312	4,79627E-4	0,05	1	0,21662	0,90338
PestaAU2 B. rhodina	0,18	0,11106	2,29217	0,59353	0,05	0	-0,16338	0,52338
CeA9f CeAu2F4	2,4	0,11106	30,5623	1,70604E-8	0,05	1	2,05662	2,74338
CeA9f Xylaria	2,16	0,11106	27,50607	1,37543E-7	0,05	1	1,81662	2,50338
CeA9f B. rhodina	1,78	0,11106	22,66704	1,17621E-7	0,05	1	1,43662	2,12338
CeA9f PestaAU2	1,6	0,11106	20,37487	2,949E-8	0,05	1	1,25662	1,94338
Phytopal CeAu2F4	3	0,11106	38,20287	8,65182E-9	0,05	1	2,65662	3,34338
Phytopal Xylaria	2,76	0,11106	35,14664	1,18432E-8	0,05	1	2,41662	3,10338
Phytopal B. rhodina	2,38	0,11106	30,30761	1,73527E-8	0,05	1	2,03662	2,72338
Phytopal PestaAU2	2,2	0,11106	28,01544	1,393E-7	0,05	1	1,85662	2,54338
Phytopal CeA9f	0,6	0,11106	7,64057	1,96969E-4	0,05	1	0,25662	0,94338

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	0,17408	0,03482	4,40709	0,00547
Error	24	0,1896	0,0079		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

ANEXO 8. Análise estatística do antagonismo dos fungos endofíticos isolados de *Caesalpinia echinata* frente ao fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

ANOVAOneWay (24-08-2009 16:53:27)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
Xylaria	5	0,56	0,11402	0,05099
B. rhodina	5	0,28	0,14832	0,06633
CeAu1F1	5	0,68	0,13038	0,05831
PestaAU2	5	0,9	0,07071	0,03162
Rhizosola	5	1,3	0,12247	0,05477

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	2,9336	0,7334	50,93056	3,2945E-10
Error	20	0,288	0,0144		
Total	24	3,2216			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,9106	0,16129	0,12	0,744

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
B. rhodina Xylaria	-0,28	0,07589	5,21749	0,01126	0,05	1	-0,50711	-0,05289
CeAu1F1 Xylaria	0,12	0,07589	2,23607	0,52544	0,05	0	-0,10711	0,34711
CeAu1F1 B. rhodina	0,4	0,07589	7,45356	3,21408E-4	0,05	1	0,17289	0,62711
PestaAU2 Xylaria	0,34	0,07589	6,33553	0,00191	0,05	1	0,11289	0,56711
PestaAU2 B. rhodina	0,62	0,07589	11,55302	7,62697E-7	0,05	1	0,39289	0,84711
PestaAU2 CeAu1F1	0,22	0,07589	4,09946	0,06046	0,05	0	-0,00711	0,44711
Rhizosola Xylaria	0,74	0,07589	13,78909	5,81818E-8	0,05	1	0,51289	0,96711
Rhizosola B. rhodina	1,02	0,07589	19,00658	1,64547E-8	0,05	1	0,79289	1,24711
Rhizosola CeAu1F1	0,62	0,07589	11,55302	7,62697E-7	0,05	1	0,39289	0,84711
Rhizosola PestaAU2	0,4	0,07589	7,45356	3,21408E-4	0,05	1	0,17289	0,62711

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	0,01382	0,00346	0,68354	0,61159
Error	20	0,10112	0,00506		

At the 0.05 level, the population variations are not significantly different

ANEXO 9. Análise estatística do antagonismo dos fungos endofíticos isolados de *Caesalpinia echinata* frente ao fitopatógeno *Phomopsis* sp.

ANOVAOneWay (25-08-2009 18:05:54)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
B. rhodina	5	0,38	0,10954	0,04899
Xylaria	5	2,64	0,08944	0,04
PestaAU2	5	1,6	0,07071	0,03162
Phomopsi	5	4,6	0,07071	0,03162

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	47,9095	15,96983	2129,31111	0
Error	16	0,12	0,0075		
Total	19	48,0295			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,9975	0,03757	0,0866	2,305

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Xylaria B. rhodina	2,26	0,05477	58,35295	1,43401E-7	0,05	1	2,1033	2,4167
PestaAU2 B. rhodina	1,22	0,05477	31,50026	0	0,05	1	1,0633	1,3767
PestaAU2 Xylaria	-1,04	0,05477	26,85268	0	0,05	1	-1,1967	-0,8833
Phomopsi B. rhodina	4,22	0,05477	108,95993	0	0,05	1	4,0633	4,3767
Phomopsi Xylaria	1,96	0,05477	50,60698	0	0,05	1	1,8033	2,1167
Phomopsi PestaAU2	3	0,05477	77,45967	0	0,05	1	2,8433	3,1567

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	0,01112	0,00371	1,85333	0,17823
Error	16	0,032	0,002		

At the 0.05 level, the population variations are not significantly different.

ANEXO 10. Análise estatística do antagonismo dos fungos endofíticos isolados de *Caesalpinia echinata* frente ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

ANOVAOneWay (24-08-2009 16:31:18)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
Xylaria	5	1,12	0,08367	0,03742
B. rhodina	5	0,4	0,24495	0,10954
CeAu1F1	5	2,34	0,13416	0,06
CeAu2F4	5	1,7	0,07071	0,03162
Colletoglo	5	3,58	0,08367	0,03742

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	29,4424	7,3606	379,41237	0
Error	20	0,388	0,0194		
Total	24	29,8304			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,98699	0,07619	0,13928	1,828

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
B. rhodina Xylaria	-0,72	0,08809	11,5589	7,56747E-7	0,05	1	-0,9836	-0,4564
CeAu1F1 Xylaria	1,22	0,08809	19,58592	1,76631E-8	0,05	1	0,9564	1,4836
CeAu1F1 B. rhodina	1,94	0,08809	31,14482	0	0,05	1	1,6764	2,2036
CeAu2F4 Xylaria	0,58	0,08809	9,31134	1,84475E-5	0,05	1	0,3164	0,8436
CeAu2F4 B. rhodina	1,3	0,08809	20,87024	2,14327E-7	0,05	1	1,0364	1,5636
CeAu2F4 CeAu1F1	-0,64	0,08809	10,27458	4,48736E-6	0,05	1	-0,9036	-0,3764
Colletoglo Xylaria	2,46	0,08809	39,49292	0	0,05	1	2,1964	2,7236
Colletoglo B. rhodina	3,18	0,08809	51,05182	0	0,05	1	2,9164	3,4436
Colletoglo CeAu1F1	1,24	0,08809	19,907	2,03732E-7	0,05	1	0,9764	1,5036
Colletoglo CeAu2F4	1,88	0,08809	30,18158	0	0,05	1	1,6164	2,1436

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	0,08128	0,02032	5,32495	0,00437
Error	20	0,07632	0,00382		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.

ANEXO 11. Análise estatística do antagonismo dos fungos endofíticos isolados de *Caesalpinia echinata* frente ao fitopatógeno *Pestalotiopsis* sp.

ANOVAOneWay (24-08-2009 16:09:40)

Descriptive Statistics

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
Xylaria	5	2,36	0,21909	0,09798
B. rhodina	5	1,48	0,04472	0,02
CeAu2F3	5	2,5	0,07071	0,03162
CeAu2F4	5	2,2	0,12247	0,05477
CeA9f	5	3,2	0,07071	0,03162
PestaAU2	5	1,6	0,15811	0,07071
CeAu2F1	5	3,2	0,07071	0,03162
PestA8F5	5	3,5	0,22361	0,1

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	7	19,699	2,81414	145,24608	0
Error	32	0,62	0,01937		
Total	39	20,319			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,96949	0,05557	0,13919	2,505

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
B. rhodina Xylaria	-0,88	0,08803	14,13666	0	0,05	1	-1,16517	-0,59483
CeAu2F3 Xylaria	0,14	0,08803	2,24901	0,75237	0,05	0	-0,14517	0,42517
CeAu2F3 B. rhodina	1,02	0,08803	16,38567	0	0,05	1	0,73483	1,30517
CeAu2F4 Xylaria	-0,16	0,08803	2,5703	0,61345	0,05	0	-0,44517	0,12517
CeAu2F4 B. rhodina	0,72	0,08803	11,56636	1,61682E-7	0,05	1	0,43483	1,00517
CeAu2F4 CeAu2F3	-0,3	0,08803	4,81932	0,03355	0,05	1	-0,58517	-0,01483
CeA9f Xylaria	0,84	0,08803	13,49408	8,73316E-8	0,05	1	0,55483	1,12517
CeA9f B. rhodina	1,72	0,08803	27,63074	1,69818E-6	0,05	1	1,43483	2,00517
CeA9f CeAu2F3	0,7	0,08803	11,24507	2,16718E-7	0,05	1	0,41483	0,98517
CeA9f CeAu2F4	1	0,08803	16,06439	0	0,05	1	0,71483	1,28517
PestaAU2 Xylaria	-0,76	0,08803	12,20893	1,12832E-7	0,05	1	-1,04517	-0,47483
PestaAU2 B. rhodina	0,12	0,08803	1,92773	0,86681	0,05	0	-0,16517	0,40517
PestaAU2 CeAu2F3	-0,9	0,08803	14,45795	0	0,05	1	-1,18517	-0,61483
PestaAU2 CeAu2F4	-0,6	0,08803	9,63863	2,70948E-6	0,05	1	-0,88517	-0,31483
PestaAU2 CeA9f	-1,6	0,08803	25,70302	3,24388E-7	0,05	1	-1,88517	-1,31483
CeAu2F1 Xylaria	0,84	0,08803	13,49408	8,73316E-8	0,05	1	0,55483	1,12517
CeAu2F1 B. rhodina	1,72	0,08803	27,63074	1,69818E-6	0,05	1	1,43483	2,00517
CeAu2F1 CeAu2F3	0,7	0,08803	11,24507	2,16718E-7	0,05	1	0,41483	0,98517
CeAu2F1 CeAu2F4	1	0,08803	16,06439	0	0,05	1	0,71483	1,28517
CeAu2F1 CeA9f	0	0,08803	0	1	0,05	0	-0,28517	0,28517
CeAu2F1 PestaAU2	1,6	0,08803	25,70302	3,24388E-7	0,05	1	1,31483	1,88517
PestA8F5 Xylaria	1,14	0,08803	18,3134	0	0,05	1	0,85483	1,42517
PestA8F5 B. rhodina	2,02	0,08803	32,45006	0	0,05	1	1,73483	2,30517
PestA8F5 CeAu2F3	1	0,08803	16,06439	0	0,05	1	0,71483	1,28517
PestA8F5 CeAu2F4	1,3	0,08803	20,8837	6,88672E-9	0,05	1	1,01483	1,58517
PestA8F5 CeA9f	0,3	0,08803	4,81932	0,03355	0,05	1	0,01483	0,58517
PestA8F5 PestaAU2	1,9	0,08803	30,52233	9,34589E-9	0,05	1	1,61483	2,18517
PestA8F5 CeAu2F1	0,3	0,08803	4,81932	0,03355	0,05	1	0,01483	0,58517

Sig equals 1 indicates that the means difference is significant at the 0.05 level.
 Sig equals 0 indicates that the means difference is not significant at the 0.05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	7	0,11324	0,01618	2,37724	0,04471
Error	32	0,21776	0,0068		

At the 0.05 level, the population variations are significantly different.