

**RENATA RODRIGUES GOMES**

***Phomopsis* spp. ENDÓFITOS DE PLANTAS MEDICINAIS: DIVERSIDADE  
GENÉTICA E ANTAGONISMO AO FUNGO *Guignardia citricarpa***

**2008**

**RENATA RODRIGUES GOMES**

***Phomopsis* spp. ENDÓFITOS DE PLANTAS MEDICINAIS: DIVERSIDADE  
GENÉTICA E ANTAGONISMO AO FUNGO *Guignardia citricarpa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Chirlei Glienke

Co-orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo.

**CURITIBA**

**2008**

## **AGRADECIMENTOS**

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Chirlei Glienke, pela oportunidade, ensinamentos, inestimáveis sugestões e contribuições oferecidas, as quais, sem dúvidas, muito enriqueceram o trabalho. Sobretudo pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica.*

*Ao meu co-orientador, Prof. Dr. João Lucio Azevedo, pela dedicação e valorização da pesquisa científica e pela oportunidade de realização desse trabalho.*

*À minha banca de acompanhamento, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Dalzoto e a Dr<sup>a</sup> Kátia Rodrigues, pelas sugestões e contribuições oferecidas, cooperando para o desenvolvimento desse trabalho.*

*Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Lygia Vitória Galli-Terasawa e Vanessa Kava-Cordeiro pela convivência, sugestões e auxílio no LabGeM.*

*Ao Dr. Álvaro Almeida da EMBRAPA de Londrina-PR, e a Dr<sup>a</sup> Sônia Pillegi pelas linhagens de Phomopsis que muito contribuíram para elucidação da pesquisa.*

*Ao Prof. Dr. José Odair Pereira e a MsC Antonia Souza da Universidade Federal do Amazonas e a MsC Josiane Gomes pelas linhagens de Pestalotiopsis utilizadas neste trabalho.*

*À EMBRAPA, de Colombo, Paraná, pela disponibilidade da coleta de folhas de espinheira santa.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thelma Alvim que sempre se disponibilizou no auxílio a microscopia ótica.*

*Aos Professores do Mestrado em Genética, que contribuíram para minha formação.*

*Aos meus amigos de turma da pós-graduação Carolina Abuázar, Caroline Bernardi, Clíneu Uehara, Daniele Matoso, Dellyana Boberg, Fabio Rigoti, Márcia Oliveira, Patrícia de França, Thaís Sczepanski, Virginia Coser e Vitor Dantas pelos momentos de convivência e conforto durante essa jornada. Sem vocês jamais suportaria a saudade.*

*À minha amiga Tatiane pelos momentos alegres na convivência diária, pelo carinho, companheirismo, pelo conforto durante as minhas preocupações e receios*

*dentro e fora do laboratório. Assim como pelas excelentes idéias que muito contribuíram neste trabalho.*

*Aos alunos de Pós-graduação do LabGeM, Jociney, Josiele, Josiane, em especial a Danyelle e Juliana pela amizade e cooperação no desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao doutorando Rafael Noletto, do Laboratório de Citogenética Animal, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos amigos do LabGeM pela agradável convivência e ajuda nos momentos mais difíceis, André, Carol Andrade, Carol Silvano, Douglas, Flávia, Fernanda, Larice, Lisiane, Lucinir, Maysa, Patrícia, Rosana e Taciana.*

*À amiga Izolde Gartner, pela ajuda e disponibilidade.*

*À Anilda Gomes da Silva, pelo eventual auxílio técnico na SEAD.*

*À Luciana Marques, secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética, pelas orientações e informações.*

*Aos meus pais, Gislene Rodrigues Gomes e Raimundo de Andrade Gomes, por terem ensinado a buscar meus ideais e pelo esforço e compreensão em manterem-se distantes todos esses anos que dediquei aos estudos.*

*Ao meu companheiro Helder Franklin, pela compreensão, o carinho e pela sua admirável placidez, sobretudo ao apoio e contribuição para a realização deste ideal.*

*Aos meus amigos e familiares pelo carinho, compreensão e incentivo nesse período de ausência. Sobretudo pelos exemplos de dedicação e respeito ao próximo.*

*À minha amiga Hafiza pelos conselhos, compreensão, incentivo, paciência e apoio.*

*“De tudo ficaram três coisas:*

*A certeza de que estamos sempre começando...*

*A certeza de que precisamos continuar...*

*A certeza de que seremos interrompidos antes  
de terminar...*

*Portanto devemos:*

*Fazer da interrupção um caminho novo...*

*Da queda um passo de dança...*

*Do medo, uma escada...*

*Do sonho, uma ponte...*

*Da procura, um encontro...”*

**(Fernando Pessoa)**

## RESUMO

### ***Phomopsis* spp. ENDÓFITOS DE PLANTAS MEDICINAIS: DIVERSIDADE GENÉTICA E ANTAGONISMO AO FUNGO *Guignardia citricarpa***

Autora: Renata Rodrigues Gomes

Orientadora: Chirlei Glienke

Microrganismos endofíticos vivem no interior das plantas sem causar dano ao seu hospedeiro, podendo produzir compostos biologicamente ativos, antibióticos, fungicidas e herbicidas. Essa comunidade endofítica pode estar relacionada com a ação antimicrobiana de plantas medicinais. A planta *Maytenus ilicifolia*, conhecida como espinheira-santa, é uma planta medicinal muito utilizada no tratamento de úlceras gástricas e tratamentos digestivos, típica da América do Sul, em especial da região Sul do Brasil e atualmente encontra-se ameaçada de extinção. As plantas medicinais *Spondias mombin*, *Myracrodruon urundeuva*, *Schinus terebinthifolius* e *Aspidosperma tomentosum* têm sido usadas na medicina devido as suas propriedades antimicrobianas. No presente trabalho foram isolados fungos endofíticos do gênero *Phomopsis* e avaliados quanto a sua variabilidade genética e estrutura populacional por meio de marcadores RAPD. Observou-se que as plantas medicinais analisadas são colonizadas por grande diversidade de espécies de *Phomopsis* com grande variabilidade morfológica e genética intra e interespecíficas. Os isolados foram identificados por meio de seqüências das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do DNA ribossomal e testados quanto ao potencial antimicrobiano contra as linhagens PC13/96 e PC33/05 de *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta do Citros. Foi possível identificar nove isolados em nível de espécie por meio de seqüências ITS do rDNA sendo, 4 como *P. michaeliae*, 2 como *P. theicola*, 2 como *P. longicolla* e 1 como *P. sojae*. Foi possível verificar que as plantas de *Maytenus ilicifolia* analisadas são colonizadas endofiticamente por pelo menos dez espécies de *Phomopsis* e as plantas de *Schinus terebinthifolius* por pelo menos seis espécies deste gênero. As análises morfológicas, por meio de marcadores RAPD e sequenciamento de ITS do rDNA, permitem sugerir que as espécies de *Phomopsis* analisadas não são hospedeiro-específicas, sendo necessária a redefinição do conceito de espécie para este gênero. Na análise antimicrobiana todos os isolados apresentaram grande potencial no controle *in vitro* do fungo *G. citricarpa*, destacando-se os isolados ESDF1 (*Phomopsis* sp. S7), A134 (*Phomopsis* sp.), A115B (*Phomopsis* sp.), ES2AB1 (*Phomopsis* sp. S6), ES2WF1 (*Phomopsis* sp. S4) e ESFH1 (*P. theicola*) que inibiram o crescimento das linhagens PC13/96 e PC33/05 de *G. citricarpa* em três metodologias avaliadas. Desta forma esse estudo indica que os isolados de *Phomopsis* spp. endófitos de plantas medicinais são produtores de substâncias bioativas que devem ser melhor caracterizadas.

Palavras chaves: *Phomopsis* spp., endófitos, plantas medicinais, RAPD, seqüências da região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA

## ABSTRACT

### ***Phomopsis* spp. ENDOPHYTES OF MEDICINAL PLANTS: GENETIC DIVERSITY AND ANTAGONISM IN THE FUNGUS *Guignardia citricarpa***

Author: Renata Rodrigues Gomes

Adviser: Chirlei Glienke-Blanco

Endophytic microorganisms live in plants without causing damage to their host, being able to produce active biological compounds, antibiotics, fungicides and herbicides. This endophytic community may be related to the antimicrobial action of medicinal plants. The plant *Maytenus ilicifolia*, known as “espinheira santa”, is a medicinal plant greatly used for the treatment of stomach ulcers and digestive problems, typical from the South America, especially in the southern part of Brazil and currently is in danger of extinction. The medicinal plants, *Spondias mombin*, *Myracrodruon urundeuva*, *Schinus terebinthifolius* and *Aspidosperma tomentosum* have been used in medicine due to their antimicrobial properties. In the present work, endophytic fungi of the genus *Phomopsis* were isolated and their genetic variability and population structure assessed using RAPD markers. The medicinal plants analyzed are colonized by a great variety of *Phomopsis* species, with a high morphological and genetic variability, both intra and interspecific. The isolated fungi were identified through sequences of ITS1, 5,8S and ITS2 regions of ribosomal DNA and tested in their antimicrobial potential against the PC13/96 and PC33/05 lineages of *Guignardia citricarpa*, the responsible for the “black spot in Citrus”. It was possible to identify 9 isolates at the level of species through the analysis of ITS sequences of rDNA, and among these isolates, 4 were identified as *P. michaeliae*, 2 as *P. theicola*, 2 as *P. longicolla* and 1 as *P. sojae*. It was possible to verify that the *Maytenus ilicifolia* plants analyzed are endophytically colonized by at least ten *Phomopsis* species and that *Schinus terebinthifolius* are colonized by at least six species of this genus. The morphological analyses, using RAPD markers and sequencing of ITS regions of rDNA, make possible to suggest that the analyzed species of *Phomopsis* are not host-specific, being necessary the redefinition of the species concept for this genus. For the antimicrobial analysis, all the isolates presented a high *in vitro* control potential of the fungus *G. citricarpa*, particularly the isolates ESDF1 (*Phomopsis* sp. S7), A134 (*Phomopsis* sp.), A115B (*Phomopsis* sp.), ES2AB1 (*Phomopsis* sp. S6), ES2WF1 (*Phomopsis* sp. S4) and ESFH1 (*P. theicola*) that inhibited the growth of the PC13/96 and PC33/05 lineages of *G. citricarpa* in the three methodologies tested. Thus, this study indicates that the isolates of *Phomopsis* spp. endophytic of medicinal plants are producers of bioactive substances, which should be better characterized.

**Key words:** *Phomopsis* spp., endophytes, medicinal plants, RAPD, ITS1, 5,8S and ITS2 of rDNA sequences.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* DE *Spondias mombin* (SM9713; SM9638; SM9714; SM9631); *Myracrodruon urundeuva* (MU0123); *Aspidosperma tomentosun* (AT9810; AT 9811 e AT 9906) EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA..... 59
- FIGURA 2- MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE AROEIRA (*Schinus terebinthifolius*) EM TRÊS MEIOS DE CULTURA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA..... 61
- FIGURA 3- MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE *Maytenus ilicifolia* EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA..... 64
- FIGURA 4- MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS PATOGÊNICOS OBTIDOS DE *Glycine max* EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA..... 68
- FIGURA 5- DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* sp. EM MEIO MEA , APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO, A 22 °C, SOB LUZ CONTÍNUA..... 69
- FIGURA 6- DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* spp EM MEIO BDA , APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO, A 22 °C, SOB LUZ CONTÍNUA..... 70
- FIGURA 7- AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DO DIÂMETRO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* spp EM MEIO AV , APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO, A 22 °C, SOB LUZ CONTÍNUA..... 71
- FIGURA 8- FOTOMICROGRAFIA DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* EM BDA APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA..... 73
- FIGURA 9- FOTOMICROGRAFIA DOS CONÍDIOS DO ISOLADO SM97.13 EM MEIOS BDA e AV APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB



	LUZ CONTÍNUA.....	74
FIGURA 10-	COMPRIMENTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> spp. APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO EM BDA A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA.....	75
FIGURA 11-	DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> .....	77
FIGURA 12-	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> .....	78
FIGURA 13-	PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O OLIGONUCLEOTÍDEO OPX11 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> sp. E GRUPO EXTERNO <i>Pestalotiopsis</i> .....	79
FIGURA 14-	PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O OLIGONUCLEOTÍDEO OPX14 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> sp. E GRUPO EXTERNO <i>Pestalotiopsis</i> .....	79
FIGURA 15-	PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O OLIGONUCLEOTÍDEO OPX19 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> sp. E GRUPO EXTERNO <i>Pestalotiopsis</i> .....	80
FIGURA 16-	PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O OLIGONUCLEOTÍDEO OPE 08 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> sp. E GRUPO EXTERNO <i>Pestalotiopsis</i> .....	80
FIGURA 17-	DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD.....	82
FIGURA 18-	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> ..	84
FIGURA 19-	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA SEQÜÊNCIA DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO rDNA DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> spp. (MÉTODO DE PARCIMÔMIA).....	86
FIGURA 20-	ÁRVORE FILOGENÉTICA PARCIAL BASEADA NA SEQÜÊNCIA DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO rDNA DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> spp. (MODELO: NEIGHBOR-JOINING COM CORREÇÃO KIMURA DOIS PARÂMETROS).....	87

FIGURA 21-	INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> CONTRA <i>Guignardia citricarpa</i> PC13/96 PELA TÉCNICA DE CULTURA PAREADA.....	93
FIGURA 22-	INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> CONTRA <i>Guignardia citricarpa</i> 33/05 PELA TÉCNICA DE CULTURA PAREADA.....	96
FIGURA 23-	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS DO FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96 e PC33/05, INOCULADAS APÓS RETIRADA DO PAPEL CELOFANE PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS EM MEIO BDA, APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C.....	98
FIGURA 24-	AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DA LINHAGEM PC33/05 DE <i>G. citricarpa</i> EM MEIO BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C.....	99
FIGURA 25-	AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DA LINHAGEM PC13/96 DE <i>G. citricarpa</i> EM MEIO BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C.....	100

## LISTA DE TABELAS

TABELA	1-	ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> spp. PERTENCENTES À COLEÇÃO DO LABGEM/UFPR.....	32
TABELA	2-	ISOLADOS GRUPO EXTERNO PARA ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD.....	35
TABELA	3-	ÉPOCAS DO ANO, ÓRGÃOS DA PLANTA, CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO E N° DE FRAGMENTOS PLAQUEADOS NAS QUATRO COLETAS DE ENDÓFITOS DE ESPINHEIRA-SANTA.....	42
TABELA	4-	SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL.....	47
TABELA	5-	SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL.....	49
TABELA-	6-	Linhagens de <i>Phomopsis</i> spp. E de <i>Pestalotiopsis vismae</i> utilizadas como grupo externo.....	52
TABELA	7-	PORCENTAGEM DE ISOLAMENTO DE <i>Phomopsis</i> ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DE ESPINHEIRA SANTA.....	56
TABELA	8-	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO E TIPOS DE INTERAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> E <i>Guignardia citricarpa</i> – PC13/96.....	94
TABELA	9-	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO E TIPOS DE INTERAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> E <i>Guignardia citricarpa</i> – PC33/05.....	96
TABELA	10-	AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DA LINHAGEM PC13/96 E PC33/05 DE <i>G. citricarpa</i> EM MEIO BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C.....	101

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO	1-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS EM DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	125
ANEXO	2-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS EM DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> EM MEIO BDA.....	126
ANEXO	3-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS EM DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> EM MEIO AVEIA.....	128
ANEXO	4-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS EM DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> EM MEIO MEA.....	130
ANEXO	5-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS ESPOROS BETACONÍDIOS DOS ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> spp EM MEIO BDA.....	132
ANEXO	6-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> CONTRA O FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96.....	134
ANEXO	7-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> CONTRA O FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96.....	135
ANEXO	8-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> CONTRA O FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96.....	136
ANEXO	9-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> CONTRA O FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC33/05.....	137
ANEXO	10-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> CONTRA O FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC33/05 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS.....	139
ANEXO	11-	ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Phomopsis</i> CONTRA O	

		FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS.....	141
ANEXO	12-	MATRIZ DE DADOS PARA CARACTERIZAÇÃO.....	143
ANEXO	13-	LOCAL DA COLETA DE FOLHAS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> . CENTRO POLITÉCNICO – CURITIBA/ PR.....	149

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Microrganismos Endofíticos.....	4
3.2 Ocorrência de endófitos.....	7
3.3 Fungos endofíticos de plantas medicinais.....	9
3.4 Endófitos Produtores de Substâncias Antimicrobianas .....	11
3.5 <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.....	14
3.5.1 Componentes químicos e propriedades terapêuticas.....	16
3.5.2 Endófitos isolados de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	18
3.6 <i>Guignardia citricarpa</i> Kiely e a Mancha preta do citros.....	18
3.6.1 Mancha Preta do Citros.....	21
3.7 O Gênero <i>Phomopsis</i> sp.....	22
3.8 Marcadores Moleculares.....	25
3.8.1 Marcadores RAPD.....	27
3.8.2 Marcadores ITS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Material Biológico.....	32
4.1.1 Fungos endofíticos.....	32
4.1.2 Microrganismos usados para teste de antagonismo.....	35
4.1.3 Fungos endofíticos utilizados para análise de variabilidade genética.....	35
4.2 Meios de Cultura.....	35
4.2.1 Caldo MEB (Extrato de Malte) .....	35
4.2.2 Meio AV (Aveia-Ágar) .....	36
4.2.3 Meio BDA (Meio Batata-Dextrose-Ágar) .....	36
4.2.4 Meio MC (Meio Completo) PONTECORVO <i>et al.</i> , 1953.....	37

4.2.5 Meio MEA (Extrato de Malte) PATERSON e BRIDGE, 1994.....	37
4.3 Soluções e Reagentes.....	38
4.3.1 Clorofane.....	38
4.3.2 Clorofil.....	38
4.3.3 Derozal Bayer®.....	38
4.3.4 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%.....	38
4.3.5 Fenol Saturado.....	38
4.3.6 Gel de Agarose (0,8%).....	38
4.3.7 Gel de Agarose (1,5%).....	38
4.3.8 Lactofenol azul.....	38
4.3.9 Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com <i>Hind</i> III Gibco) .....	39
4.3.10 Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100pb Ludwing Biotec).....	39
4.3.11 Oligonucleotídeos (Invitrogen).....	39
4.3.12 RNase (invitrogen).....	39
4.3.13 Solução de Vitaminas.....	40
4.3.14 Solução salina (p/v).....	40
4.3.15 Solução Tween-80 0,1% (v/v) .....	40
4.3.16 Solução de Tetraciclina.....	40
4.3.17 Solução de EDTA 0,5M.....	40
4.3.18 Solução de brometo de etídio.....	40
4.3.19 Tampão TE (Tris-EDTA) .....	41
4.3.20 Tampão de Extração de DNA.....	41
4.3.21 Tampão da Amostra (6x) .....	41
4.3.22 Tampão de corrida TBE 10x.....	41
4.4 Isolamento.....	42
4.5 Conservação dos fungos.....	43
4.6 Caracterização morfológica.....	43
4.7 Obtenção de colônia monospórica.....	44

4.8 Caracterização Molecular.....	44
4.8.1 Extração do DNA (RAEDER e BRODA, 1985; modificado por GLIENKE, 1995) .....	44
4.8.2 RAPD.....	45
4.8.2.1 Análise da Variabilidade Genética.....	46
4.8.3 Seqüenciamento da região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA.....	47
4.8.3.1 Amplificação.....	47
4.8.3.2 Purificação da PCR.....	48
4.8.3.2.1 Purificação com PEG.....	48
4.8.3.2.2 Purificação com Acetato de Amônio.....	48
4.8.3.3 Reação de Seqüenciamento.....	49
4.8.3.4 Purificação da Reação de Seqüenciamento.....	50
4.8.3.4.1 Purificação com Isopropanol em tubos.....	50
4.8.3.4.2 Purificação com Purificação com Isopropanol em placa.....	50
4.8.3.4.3 Purificação com Acetato de Amônio.....	51
4.8.3.5 Edição e Análise das Seqüência.....	51
4.9 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	52
4.9.1 Cultura Pareada.....	52
4.9.2 Avaliação de metabólitos não voláteis.....	53
4.9.3 Atividade dos Extratos metanólicos.....	54
4.9.3.1 Obtenção dos extratos.....	54
4.9.3.2 Crescimento micelial.....	55
4.10 Análise Estatística.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Isolamento .....	56
5.2 Caracterização morfológica de <i>Phomopsis</i> .....	58
5.3 Caracterização Molecular de <i>Phomopsis</i> spp. ....	78
5.3.1 RAPD.....	78
5.3.2 Seqüenciamento da região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA .....	85



5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	92
5.4.1 Cultura pareada.....	92
5.4.2 Teste para detecção de metabólitos não voláteis .....	97
5.4.3 Avaliação da ação dos Extratos.....	98
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
ANEXOS.....	125

## 1. INTRODUÇÃO

A bioprospecção visa identificar plantas e microrganismos, dentre a diversidade de vida existente em determinado local, que possam servir como fonte de substâncias bioativas que, em última instância, sejam úteis para o desenvolvimento de novas drogas. Neste contexto, os fungos endofíticos são considerados de grande importância, pois representam uma fonte potencial de novos compostos químicos e biológicos, podendo ser utilizados não somente na Medicina, mas também na Fitopatologia e Veterinária (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003). O potencial de aplicação de microrganismos endofíticos no controle biológico, também vem sendo explorado.

Os microrganismos endofíticos vivem no interior das plantas, interagindo com diferentes espécies, sem causar dano ao seu hospedeiro. Esses microrganismos podem influenciar várias características das plantas e conferir certos benefícios a este vegetal como, por exemplo, produção de antibióticos. Há alguns anos não se conhecia a grande potencialidade dos endofíticos, entretanto, este interesse vem aumentando com a descoberta recente de características como a produção de compostos biologicamente ativos, antibióticos, fungicidas e herbicidas.

Plantas medicinais com propriedades antimicrobianas também são habitadas por microrganismos endofíticos, sugerindo que a ação antibacteriana ou antifúngica poderia estar no endófito e não na planta, ou provavelmente na sua interação. No Brasil vários autores mostraram a produção de fármacos por endófitos como *Xylaria* sp., *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e também *Phomopsis* sp.

Fungos do gênero *Phomopsis*, são encontrados como endófitos nos espaços intercelulares de tecidos de diversos vegetais, entre eles a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss.), planta pertencente à família Celastraceae. Essa planta medicinal, encontrada principalmente no sul do Brasil, foi acrescentada à lista das espécies consideradas em extinção no Paraná, pelo governo do Estado em 1995. Tendo em vista que pouco se conhece a respeito da comunidade endofítica existente nessa planta, sua diversidade e seu potencial antimicrobiano, tornam-se relevantes estudos de diversidade e bioprospecção.

Pileggi (2006) demonstrou existir alta diversidade de isolados do gênero *Colletotrichum*, dentre outros fungos filamentosos, bactérias e actinomicetos em plantas de *Maytenus ilicifolia* do pomar do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (CNPQ), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/PR). Alguns desses isolados apresentaram potencial antimicrobiano, inibindo o crescimento de *Fusarium* sp., *Guignardia citricarpa* e *Micrococcus luteus*.

Endófitos com atividade antagonista contra o fungo *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros (MPC), poderiam ser utilizados no controle biológico desta doença, uma vez que o emprego sucessivo de fungicidas como controle de doenças de plantas apresenta, dentre outros problemas, a seleção de linhagens resistentes do patógeno.

O gênero *Phomopsis* representa uma fonte potencial de novos compostos químicos e biológicos, como vem sendo relatado em diversos trabalhos. Oito dos isolados que foram estudados nesse trabalho já haviam sido avaliados no IOC/FIOCRUZ/RJ e possuem potencial antimicrobiano (RODRIGUES *et al.*, 2004). Porém tais isolados ainda não haviam sido caracterizados geneticamente, nem identificados em nível de espécie. A identificação e a caracterização molecular dos microrganismos endofíticos são úteis, pois o gênero *Phomopsis* é de difícil identificação em nível de espécie, utilizando-se apenas características morfológicas.

Estudos moleculares são realizados na busca de padrões genéticos nestes organismos, complementando sua caracterização. O polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) propicia uma forma rápida para avaliar a diversidade genética existente nestes organismos, a estruturação populacional e para auxiliar na identificação ao nível de espécie, comparando-as com linhagens referência. Outra estratégia importante nessa caracterização, baseia-se em marcadores de Sequências Internas Transcritas do DNA Ribossômico (ITS) para identificação taxonômica dos isolados.

## 2. OBJETIVOS

1. Isolar linhagens endofíticas de *Phomopsis* spp. de plantas sadias de *Maytenus ilicifolia* e Identificar os isolados utilizando-se características morfológicas;
2. Caracterização de *Phomopsis* spp. endofíticos das plantas medicinais: *Schinus terebinthifolius*, *Myracrodruon urundeuva*, *Spondias mombin*, *Aspidosperma tomentosum* pertencentes à coleção do LABGEM.
3. Avaliar a variabilidade genética e estrutura populacional das linhagens de *Phomopsis* spp por meio de marcadores RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso);
4. Identificar as linhagens por meio de seqüências da região ITS1, 5,8S e ITS2 do DNA ribossomal;
5. Testar a atividade antimicrobiana de linhagens do fungo *Phomopsis* spp. contra linhagens do fitopatógeno *Guignardia citricarpa*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microrganismos Endofíticos

Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior das plantas, interagindo com outras espécies de microrganismos, sem causar dano ou prejuízo ao seu hospedeiro. Esses microrganismos podem influenciar em várias características expressas pelas plantas. Segundo Neto, Azevedo e Araujo (2002), os endófitos podem desempenhar relevante função para a sanidade vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, no controle de insetos e até na proteção da planta contra herbívoros. Todas as plantas já estudadas são habitadas por microrganismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias.

A comunidade endofítica, cuja composição varia em função do hospedeiro e das condições ambientais, tem indivíduos que se inter-relacionam dentro da planta, em um equilíbrio harmônico. O desequilíbrio dessa harmonia afeta o comportamento de todos os integrantes da comunidade, dando condições para que fungos oportunistas manifestem seu potencial patológico contra hospedeiro (MAKI, 2006).

A distinção entre endofíticos, fitopatogênicos e oportunistas é puramente didática. Há um gradiente tênue que os separa e, assim, à distância entre um e outro pode ser muito pequena, sendo difícil impor limites para separar cada categoria. Assim, um microrganismo pode ser considerado endofítico, mas com a redução dos mecanismos de defesa da planta pode se comportar como um patógeno (AZEVEDO *et al.*, 2000).

A ocorrência de microrganismos endofíticos nos vegetais resulta da penetração através de feridas ocasionadas nas raízes pela abrasão destas com o solo, aberturas naturais, como hidatódios e estômatos, aberturas artificiais sofridas pela ação de pragas, animais e o homem ou agressões abióticas (RIBEIRO, 1995), ou ainda através da secreção de enzimas hidrolíticas (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004). A penetração pode ocorrer por meio de esporos levados pelo vento ou hifas que invadem os tecidos. Muitos endófitos produzem massas de conídios delgados, característica associada com

a dispersão por chuvas (RIBEIRO, 1995). Outra forma de propagação se dá pela transmissão vertical por meio de sementes (WHITE, MORGAN-JONES E MORROW 1993; CLAY, 2004).

Viret e Petrini (1994) usando microscopia eletrônica de varredura e transmissão, detectaram a presença de fungos no interior dos hospedeiros. Clay (1987) verificou a presença de hifas dos fungos *Acremonium lolli* e *A. coenophialum* no espaço intercelular da região meristemática, no mesofilo das folhas, no cerne da inflorescência na semente.

Os endófitos apresentam uma relação mutualística, antagonística ou neutra com o hospedeiro. A interação de um fungo com seu hospedeiro vegetal variam e depende do modo pelo qual o fungo infecta a planta e também da extensão da resposta de defesa desta. A colonização pode ser sistêmica ou local, inter ou intracelular (ARAÚJO, SILVA E AZEVEDO, 2000).

Os fungos endofíticos atuam no controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes (ARAÚJO, SILVA E AZEVEDO, 2000). Segundo Schulz e Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas.

Esses microrganismos endofíticos podem ser utilizados como fontes de metabólitos primários (STAMFORD, ARAÚJO E STAMFORD, 1998) e secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos (LI *et al.*, 2001; LI e STROBEL, 2001; ZOU e TAN, 2001). Como exemplo pode-se citar o taxol, uma droga quimioterapêutica usada no tratamento de câncer de mama e ovário (WANG *et al.*, 2000 e STROBEL *et al.*, 2003), O ácido coletótrico, um metabólico do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da *Artemisia mongólica*, apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e contra o fungo patogênico *Helminthosporium sativum* (ZOU *et al.*, 2000). Lu *et al.* (2000) identificaram três novos metabólitos do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. isolado de *Artemisia annua* com propriedades antimicrobianas. Diversos autores relatam à ação antimicrobiana de substâncias produzidas por fungos endofíticos como Rodrigues,

Hesse e Werner (2000), Liu *et al.* (2001), Stinson *et al.* (2003), Bao e Lazarivits (2001), Huang *et al.* (2001), Strobel (2003), Rodrigues (2004), Chareprasert *et al.* (2006).

Os microrganismos endofíticos são também capazes de produzirem anti-helmínticos e inseticidas (AZEVEDO *et al.*, 2000; ESPÓSITO e AZEVEDO, 2004), apresentando grande potencial que pode ser explorado na agricultura (ZOU e TAN, 2001).

Schulz *et al.* (2002) isolaram, mais de seis mil e quinhentos fungos endofíticos de árvores e herbáceas, na busca de novos metabólitos com potencial para novos produtos industriais e sugerem que a associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros conduza à produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e anti-herbicida.

Autores sugerem que certos fungos endofíticos produzem compostos igualmente presentes em suas plantas hospedeiras, como o taxol, utilizado para o tratamento de câncer, presente tanto na planta medicinal *Taxus brevifolia*, como no fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STIERLE *et al.*, 1995). Outros exemplos são algumas enzimas (celulases e lignases) em *Xylaria* sp., fatores de crescimento como giberelina em *Fuzarium moniliforme*. Indicando uma possível transposição de genes entre plantas e fungos em uma verdadeira engenharia genética *in vivo*. Se esses casos forem confirmados, ficará evidente que vegetais e fungos transgênicos podem ocorrer naturalmente pela transferência de genes entre espécies pertencentes a diferentes reinos (AZEVEDO, 1998).

Rodrigues; Hesse e Werner (2000) pesquisaram a atividade bioativa de extratos de fungos endofíticos isolados da planta *Spondias mombin* L (cajazeiro). Estes extratos, incluindo o de *Phomopsis* sp., foram testados contra determinados microrganismos. O fungo apresentou atividade contra actinomicetos, *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*.

Além da produção de antimicrobianos, fungos endofíticos podem excluir patógenos que ocupem o mesmo nicho ecológico, por competição, como relatado por Bao e Lazarovits (2001) com *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* patogênico e *Fusarium oxysporum* não patogênico.

Os fungos endofíticos são de grande importância, pois representam uma fonte potencial de novos compostos químicos e biológicos, podendo ser utilizados não somente na Medicina, mas também na Fitopatologia e Veterinária (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003). Tendo em vista essa importância, vários trabalhos vêm sendo recentemente publicados envolvendo a capacidade de endofíticos antagonizarem fitopatógenos, assim como, são descobertos e descritos metabólitos e outras substâncias de interesses produzidos por endofíticos.

### 3. 2 Ocorrência de endófitos

Uma diversidade de microrganismos endofíticos está presente no interior de plantas aparentemente saudáveis com potencial para serem estudadas. A composição das espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação. Uma ou duas espécies são predominantes como endofíticas em um dado hospedeiro, enquanto outros isolados são pouco freqüentes (CARROLL, 1978; ARNOLD, 2003)

Petrini, Stone e Carroll (1982) verificaram um padrão de dominância de espécies em que o endófito encontrado com maior freqüência em uma determinada espécie vegetal era isolado menos frequentemente de outros hospedeiros. Por outro lado, os endófitos encontrados com menor freqüência em uma planta pareciam ser menos específicos, pois eram isolados em um amplo espectro de hospedeiros, mas com baixa freqüência.

A colonização do fungo endofítico *Stagonospora* sp. no hospedeiro *Phragmites australis* ocorre de forma diferenciada no decorrer do ano. Na primavera o endófito é encontrado somente na raiz, enquanto no outono ele é encontrado em todo o vegetal (ERNEST, MENDGEN e WIRSEL, 2003). Gao *et al.* (2005) constataram uma flutuação sazonal para os endófitos isolados de *Heterosmilax japonica* Kunth, os autores verificaram maior abundancia de populações endofíticas em amostras coletadas na primavera do que no verão.



Tanto a planta hospedeira como a região onde os endofíticos são isolados pode influenciar a produção de metabólitos secundários. De acordo com dados estatísticos, Bills *et al.* (2002) compararam a produção de metabólitos de endofíticos provenientes de regiões tropicais e de regiões temperadas. Os dados revelaram que regiões tropicais são mais ricas na produção tanto de endófitos como dos metabólitos secundários.

A presença de endófitos em plantas pode variar dentro de espécies de um mesmo hospedeiro. Nestes hospedeiros também é encontrada uma grande variedade genética entre isolados endofíticos da mesma espécie. Tal variabilidade foi encontrada em isolados do fungo *Guignardia citricarpa*, obtidos de citros (GLIENKE, 1995), em duas espécies de *Colletotrichum* sp. isoladas de *Maytenus ilicifolia* (PILEGGI, 2006) e também *Pestalotiopsis* sp. isolados de *Maytenus ilicifolia* (FIGUEIREDO, 2006).

O gênero *Phomopsis* tem sido frequentemente isolado como endófito em uma grande variedade de plantas.

Azevedo *et al.* (2000) apresentaram algumas plantas hospedeiras de onde já foram isoladas espécies de *Phomopsis*, entre elas, *Sabal bermudana*, *Trachycarpus fortunei*, *Cavendishia pubescens*, *Stylosanthes guianensis*, *Anacardium occidentale* e *Mangifera indica*. Corrado e Rodrigues (2004) isolaram endofíticos de *Phomopsis* das plantas medicinais *Spondias mombin* e *Aspidosperma tomentosun*.

Bussabam *et al.* (2001) isolaram predominantemente *Phomopsis* sp. *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella* sp., e *Xylaria* sp. endófitos de folhas, pseudocaulis e rizomas de gengibre (*Amomum siamense* Criab), coletadas em dois locais na Tailândia.

Em plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.) resistentes e suscetíveis ao agente causal da vassoura da bruxa, endófitos foram identificados por características morfológicas e seqüenciamento de rDNA como pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia*, *Monilochoetes*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pleurotus*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma*, *Verticillium* e *Xylaria*. Os autores identificaram ainda alguns endófitos potencialmente antagonistas, destacando-se

*Gliocladium catenulatum*, que reduziu em 70% a incidência da vassoura da bruxa *in vivo* em plântulas de cacauero (RUBINI *et al.*, 2005).

O gênero *Phomopsis* foi isolado como endófito de graviola (*Annona muricata* L.) e pinha (*Annona squamosa* L.) dois isolados promoveram eficientemente o crescimento vegetal, mostrando-se promissores para agricultura, uma vez que são capazes de aumentar a produção dessas culturas (SILVA *et al.*, 2006). A capacidade de estimular o crescimento vegetal apresentada por esses organismos tem sido atribuída a mecanismos diretos tais como a fixação do nitrogênio, produção de fitohormônios e indiretos como antagonismo em relação a patógenos levando, conseqüentemente, ao aumento na taxa de germinação, crescimento das raízes e parte aérea, número de folhas e flores, área foliar e rendimento de culturas (SILVEIRA, 2001).

Alguns dos relatos citam o gênero *Phomopsis* como fitopatógeno isolado de *Citrus aurantium* (Laranjeira), *Citrus nobilis* (Tangerineira), *Citrus paradisi* (Pomelo), *Citrus australis* (Laranja), *Citrus sinensis* (Laranja da China), *Citrus* sp. (Citros), *Mangifera indica* (Mangueira), *Glycine max* (Soja), *Ficus carica* (Figueira) e *Anacardium occidentale* (Cajueiro) entre muitas outras plantas (CENARGEN; EMBRAPA, 2005). Foi descrito como agente causal da mancha foliar em *Myracrodruon urundeuva* (ANJOS, CHARCHAR e GUIMARÃES, 2001). O fungo *Phomopsis* sp. também é encontrado associado a sementes de *Dipteryx alata* e *Cybistax antisyphilitica* espécies comuns nos Cerrados (SANTOS, 1996).

### 3.3 Fungos endofíticos de plantas medicinais

Os microrganismos endofíticos são encontrados em muitas espécies de plantas medicinais. A ação antimicrobiana de algumas dessas plantas poderiam estar relacionadas à sua comunidade endofítica, sugere-se então, que o princípio ativo antimicrobiano pode ser produzido pelo microrganismo e não propriamente pelo vegetal, ou provavelmente pela interação planta-hospedeiro.

As plantas *Aspidosperma tomentosum* e *Spondias mombin* são utilizada no Brasil devido as suas propriedades antimicrobianas. A avaliação dos metabólitos

secundários produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado dessas plantas demonstraram excelentes resultados na inibição de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CORRADO e RODRIGUES, 2004).

Rodrigues, Hesse e Werner (2000) avaliaram metabólitos produzidos por fungos endofíticos isolados de *Spondias mombin*, *Guignardia* sp. apresentaram atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Penicillium canadensis*. Metabólitos de *Pestalotiopsis guepinii* apresentaram atividade contra *S. cerevisiae*. Os metabólitos produzidos por *Phomopsis* sp. foram eficientes contra *Cladosporium elantum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*.

*Heterosmilax japonica* Kunth. é uma planta medicinal conhecida na China por seus efeitos diuréticos. Gao *et al.* (2005) avaliaram a comunidade de fungos endofíticos e observaram uma grande variedade de fungos colonizando o interior das plantas, entre eles *Phomopsis*, *Mycospharella*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Glomerella*, *Botryosphaeria* e *Guignardia*.

Plantas do gênero *Taxus* demonstraram atividade anticancerígena, assim como, isolados endofíticos dessas plantas. O paclitaxel e alguns de seus derivados, utilizados no tratamento de câncer são produzidos pelo fungo endofítico *Taxus andreanae*, isolado da planta medicinal *T. brevifolia* (STROBEL *et al.*, 1993; STIERLE *et al.*, 1995) e pelos fungos endofíticos *Sporormia minima* e *Trichothecium* sp. isolados da planta medicinal *T. wallichiana* (SHRESTHA *et al.*, 2001). A planta medicinal *T. marei* de onde foi isolado o fungo *Tubercularia* sp. também demonstrou atividade anticancerígena (WANG *et al.*, 2000).

O fungo *Colletotrichum* sp. foi isolado como endófito da planta medicinal *Artemisia annua*, utilizada pelos chineses como uma droga antimalárica, produziu atividade antimicrobiana contra patógenos humanos e de plantas (LU *et al.*, 2000). O fungo endofítico *C. gloeosporioides* da espécie *A. mongólica* sintetiza ácido coletótrico que apresenta atividade antimicrobiana (ZOU *et al.*, 2000).

### 3.4 Endófitos Produtores de Substâncias Antimicrobianas

A antibiose é definida como a interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (BETTIOL e GHINI, 1995). Segundo Melo (1998), muitos fungos e bactérias inibem fitopatógenos, competindo por nutrientes, parasitando e/ou produzindo metabólitos secundários como enzimas líticas e antibióticos. O resultado dessas interações antagônicas, tais como antibiose, competição, indução de defesa e parasitismo leva ao controle biológico de doenças de plantas, assim como pode desenvolver um papel muito importante na medicina com a descoberta de novos fármacos.

RODRIGUES, HESSE e WERNER (2000) pesquisaram a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de *Spondias mombin* (Anacardiaceae) contra actinomicetos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos e verificaram que os extratos de *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* inibiram o crescimento de actinomicetos. Os extratos de *Guignardia* sp. também apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp., e *Penicillium canadensis*. Metabólitos de *P. guepinii* foram ativos contra *S. cerevisiae*, e os isolados de *Phomopsis* sp. mostraram ação antifúngica contra *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*.

Liu *et al.* (2001) estudaram a atividade antifúngica de fungos endofíticos isolados de *Artemisia annua* sobre os fitopatógenos *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctnia cerealis*, *Phytophthora capsici*, *helminthosporium sativum* e *Gerlachia nivalis*, encontrando isolados com ação inibitória para todos os patógenos. Lu *et al.* (2000), estudando a mesma planta, constataram atividade de três novos metabólitos produzidos pelo fungo *Colletotrichum* sp. apresentando atividade antifúngica contra *Bacillus subtilis*, *Sataphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas* sp. *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, e inibição de crescimento dos fungos patogênicos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* e *Phytophthora capisici*.

A *Cinnamomum zeylnicum* (canela) é uma planta utilizada no tratamento de úlceras estomacais, hipertensão arterial, resfriados e dores abdominais. Ezra e Strobel (2003), isolaram dessa planta o fungo *Muscodor albus*, que apresenta ação fungicida, fungistática, bactericida e bacteriostática por emissão de compostos orgânicos voláteis. O mesmo foi relatado para o fungo *Gliocladium* sp, da planta *Eucryphia cordifolia* inibindo o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum* e *Verticillum dahliae* (STINSON *et al.*, 2003).

Citocalasinas são metabólitos fúngicos relacionados pela estrutura e atividade biológica, com capacidade antitumoral e atividade antibiótica. Estas substâncias apresentam efeitos que incluem a inibição da divisão do citoplasma e dos movimentos celulares, indução do deslocamento nuclear, retração de coágulos e agregação de plaquetas, transporte de glucose e secreção da tireóide. Recentemente, três novas citocalasinas foram relatadas como provenientes do fungo endofítico *Rhinochadiella* sp. de *Tripterygium wilfordii* (WAGENAAR *et al.*, 2000).

Li e Strobel (2001) purificaram duas ciclohexenonas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis jesteri*, isolado da planta *Fragraea bodenii* (Gentianaceae), a jesterona e a hidroxil-jesterona, das quais a primeira apresentou atividade antifúngica contra o patógeno *Pythium ultimum*. Outro metabólito, isolado de *P. microspora* isolado endofiticamente da planta *Terminalia morobensis*, a isopestacina (isobenzofuranona) também se mostrou ativo contra *Pythium ultimum*, entre outros fungos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* (STROBEL *et al.*, 2002). Adicionalmente a isopestacina apresentou atividade antioxidante contra uma variedade de radicais livres testados.

A *Monstera* sp. é uma planta que cresce sobre o tronco de árvores, dela foi isolado o endófito *Streptomyces* sp. MSU-2110 na Amazônia Peruana. Este actinomiceto produz um peptídeo denominado coronamicina, com atividade antimicrobiana contra o fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* e à bactéria *Streptococcus pneumoniae*, mas a melhor atividade foi a demonstrada contra protozoário *Plasmodium falciparum*, sugerindo potencialidade como uma droga

antimalárica. Além da coronamicina este endófito também produz outros compostos com atividades antifúngicas (EZRA *et al.*, 2004).

Castillo *et al.* (2002) isolaram e caracterizaram um antibiótico de largo espectro, a munumbicina, produzida por uma outra linhagem endofítica de *Streptomyces*, denominada NRRL 30562, isolada da planta medicinal *Kennedia nigricans*, nativa do Norte da Austrália. O extrato do endófito, obtido com solvente orgânico, foi purificado e submetido a HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Os quatro componentes principais resultantes foram denominados munumbicinas A, B, C e D. Estes compostos demonstraram, em geral, atividade contra bactérias Gram positivas, como *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistente. A munumbicina B inibiu *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), enquanto a munumbicina D apresentou atividade contra o parasita da malária *Plasmodium falciparum*. O extrato da linhagem de *Streptomyces* foi testado ainda contra vários patógenos de plantas, apresentando atividade contra *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erwinia carotovora*, *Cochliobolus carbonum* e *Penicillium* sp., mostrando o grande potencial destas novas substâncias para a medicina e agricultura.

O ácido coletotricum, produzido pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., isolado da planta medicinal *Artemisia mongolica*, apresentou inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Sarcina lutea* e atividade antifúngica contra o patógeno *Helminthosporium sativum* (ZOU *et al.*, 2000).

Corrado e Rodrigues (2004) observaram a atividade bactericida de linhagens do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas de *Aspidosperma tomentosum* e pecíolos da planta medicinal *Spondias mombin*. Todos os extratos avaliados inibiram o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras testadas, mostrando o grande potencial deste fungo como fonte de produtos bioativos.

Chareprasert *et al.* (2006) isolaram fungos endofíticos de *Tectona grandis* e de *Samanea saman* e testaram sua capacidade antimicrobiana. Dentre os isolados testados, *Phomopsis* foi o gênero dominante, produzindo substâncias inibidoras contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans*.

Além da capacidade antimicrobiana, fungos endofíticos mostram-se importantes com um grande potencial antitumoral e com habilidade em inibir enzimas, sugerindo que podem representar uma estimada fonte para uso terapêutico.

Rodrigues *et al.* (2005) verificaram que fungos endofíticos possuem a capacidade de inibir colinesterase, dentre eles linhagens de *Phomopsis* sp. Entretanto, o melhor resultado foi obtido com extratos de *Penicillium*, indicando que estes podem ter aplicações farmacêuticas.

Huang *et al.* (2001) testaram a ação de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais frente a outros fungos e tumores. Os resultados indicaram que esses fungos são importantes em medicina como agentes antimicrobianos e antitumorais.

Silva *et al.* (2005) isolaram dois novos metabólitos de *Phomopsis cassiae* endofítico de *Cassia specatabilis*, as substâncias 2,4-diidroxí-5,6-dimetil benzoato de etila e phomopsilactona, que exibiram forte atividade antifúngica contra fitopatógenos, bem como citotoxicidade contra a linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa). Outros fungos como o *Gliocladium* sp. da planta *Eucryphia cordifolia* também possuem atividade contra fungos fitopatogênicos (STINSON *et al.*, 2003; STROBEL, 2003).

Em 2001, Rodrigues-Heerklotz *et al.* elucidaram a estrutura química e a síntese assimétrica de um novo metabólito, o ácido guignardico produzido pelo fungo endofítico *Guignardia* sp., isolados de *Spondias mombin*.

São vários os relatos de fungos endofíticos produtores de substâncias antimicrobianas, inclusive isolados de plantas medicinais. Esses microrganismos tem se mostrado como uma fonte promissora de agentes bioativos, antitumorais e antifúngicos.

### **3.5 *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.**

A planta *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss pertence à classe Magnoliopsida, ordem Celastrales e família Celastraceae, a qual compreende 50 gêneros e cerca de 800 espécies (CRONQUIST, 1981). Conhecida popularmente nos diferentes países da América do Sul, pode receber diferentes denominações: congorosa, quebrachillo e

capororoca na Argentina (GONZALEZ, LOMBARDO e VALLARINO, 1937); espinheira-divina, cancorosa, cancerosa, cancosa, sombra-de-touro no Uruguai (SIMÕES *et al.*, 1986; ALICE *et al.*, 1995); coromilho-do-campo e salva-vidas (CARLINI e BRAZ, 1988); espinheira santa, espinheira-divina, erva-cancrosa e erva-santa (CARVALHO-OKANO, 1992); cancorosa-de-Deus, limãozinho, maiteno, marteno, pau-josé, salva-vidas, sombra-de-touro, no Brasil (BITTENCOURT, 2000).

É descrita como uma árvore perene, de porte arbóreo-arbustivo encontrada na mata de clima subtropical e temperado, presente em sub-bosques das florestas de Araucária, nas margens de rios e em regiões de estepes. Pode se propagar usualmente por sementes (TAYLOR-ROSA e BARROS, 1994) ou estacas de galho. Preferindo climas mais amenos, ocorrendo espontaneamente ou por meio de cultivo. A colheita das folhas pode ser feita em qualquer época do ano (PANIZZA, 1998). É nativa da América do Sul, encontrada no leste da Argentina, Paraguai, Bolívia, com menor intensidade no Chile e Uruguai. No Brasil é predominante nos estados do Sul (CARVALHO-OKANO, 1992).

*Maytenus ilicifolia* é um arbusto de ocorrência natural da Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária) (BITTENCOURT, 2001). Muitas vezes essa planta é encontrada em ambientes ciliares e nos agrupamentos arbóreos (capões) na região de predomínio das estepes (CERVI *et al.*, 1989).

Esta planta é descrita como um subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo até 5,0 m de altura. Ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados. Pecíolo com 0,2-0,5 cm de comprimento. A folha apresenta a margem inteira ou com espinhos em número de um a vários, distribuídos regular e irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos, o limbo com aproximadamente 2,2 a 8,9 cm de comprimento e 1,1 a 3,0 cm de largura e nervuras na face abaxial. Fruto cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração vermelho-alaranjada. A presença de disco nectarífero é um recurso a mais para atrair os pequenos polinizadores como himenópteros e formigas, formando um conjunto néctar-pólen interessante para a polinização, uma vez que as flores são pequenas, brancas e pouco vistosas. O florescimento ocorre entre os meses de



setembro a outubro, enquanto os frutos surgem entre outubro e fevereiro (CARVALHO-OKANO, 1992; RAMDOMSKI, 1998; BITTENCOURT, 2000).

A fragmentação da Floresta com araucárias nas últimas décadas, juntamente com a comprovação terapêutica contra males gástricos e o uso em larga escala, causaram grande devastação de populações naturais de *Maytenus ilicifolia* (BITTENCOURT, 2001).

### 3.5.1 Componentes químicos e propriedades terapêuticas

Plantas sempre foram usadas como fonte terapêutica na medicina, tanto em remédios tradicionais quanto em produtos industrializados. A planta *Maytenus ilicifolia* Mart, é geralmente utilizada na medicina popular brasileira. As folhas secas desta planta são usadas como uma infusão para aliviar dores de estômago e náuseas e no tratamento de úlceras e gastrites (CAMPAROTO *et al.*, 2002). Vários compostos isolados de *M. ilicifolia* foram descritos apresentando ação antitumoral, também usado como analgésico, antiinflamatório e antiácido (JORGE, 2004).

Esta espécie tem uso popular em comunidades tradicionais e povos indígenas no Brasil (BITTENCOURT, 2001). No Paraguai e Bolívia tribos indígenas e populações rurais a utilizam como substância controladora da fertilidade (CORDEIRO, VILEGAS e LANÇAS, 1999) e no Paraguai e Argentina é usada como contraceptiva e abortiva (MONTANARI, CARVALHO e DOLDER, 1998). Citada também com uso no tratamento de febres palustres (MEIRA PENNA, 1946), afecções pruriginosas cutâneas (COIMBRA, 1958), dispepsias (CRUZ, 1965), Inflamações úlceras e gástricas (JORGE, 2004).

As propriedades terapêuticas de *Maytenus ilicifolia* foram atribuídas à produção de compostos terpênicos, como maitenina e pristimerina, tanto pelas raízes (LIMA *et al.*, 1971; ITOKAWA *et al.*, 1991), como em ramos de folhas (JORGE *et al.*, 2004). Assim como fenóis, taninos gálicos, (CAMPAROTO *et al.*, 2002), flavonóides e outros compostos (SILVA *et al.*, 1991; LEITE *et al.*, 2001).

Jorge *et al.* (2004) avaliaram a eficácia de extratos de *M. ilicifolia* como antiinflamatório, na proteção contra lesões gástricas, incluindo a cicatrização e citoproteção, sugerindo que os extratos de *Maytenus ilicifolia* podem representar uma importante alternativa clínica em antiinflamatórios e antiulcerogênico.

Souza-Formigoni *et al.* (1991) avaliaram a potencialidade dos efeitos antiulcerogênicos das folhas de espinheira santa em experimentos realizados em ratos com úlceras. O uso de chá tanto por via oral como intraperitoneal mostrou resultados semelhantes à droga cicatrizante cimetidina. *M. ilicifolia*, assim como outras espécies da família Celastraceae foram investigadas quanto aos seus constituintes de ação citotóxica, sendo isolados triterpenos aromáticos de ação antitumoral. Segundo Itokawa *et al.* (1991; 1993) e Shiota *et al.* (1994) os triterpenos são capazes de estimular fatores atuantes na proteção da mucosa gástrica, como a produção de muco e prostaglandinas.

A cimetidina é um potente agente na supressão de ácido gástrico e pepsina, ela age como antagonista competitivo da histamina nos receptores H<sub>2</sub> das células parietais gástricas produtoras de ácido, dessa forma bloqueia a secreção ácida (SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991). Ferreira *et al.* (2004) investigaram o efeito e possível mecanismo de ação do extrato aquoso liofilizado de *M. ilicifolia* sobre a secreção de ácidos em mucosa gástrica de sapos. Foi observada uma redução de 16% da secreção ácida, sugerindo os autores que essa redução ocorra devido a uma atividade antagonística dos extratos nos receptores de H<sub>2</sub> de histidina.

Montanari, Carvalho e Dolder (1998), analisaram os efeitos de extratos etanólicos de *M. ilicifolia* na espermatogênese de camundongos, e não encontraram qualquer defeito ou distúrbio. Porém Montanari e Bevilacqua (2002), em estudos com fêmeas de ratos constataram uma diminuição significativa na implantação dos embriões com a utilização de extrato liofilizado das folhas.

### 3.5.2 Endófitos isolados de *Maytenus ilicifolia*

Pileggi (2006) isolou microrganismos endofíticos de folhas, pecíolos e sementes de *Maytenus ilicifolia* e investigou o potencial farmacológico dos mesmos. Foram isolados em maior frequência os fungos *Alternaria* sp., *Colletotricum* sp., *Bipolaris* sp., *Phyllosticta* sp. e *Cladosporium* sp.. Entre os fungos e bactérias testados, 15 apresentaram potencial para o controle biológico. Na análise de caracterização morfológica por RAPD, foi sugerida a presença de duas espécies de *Colletotricum* isolados de *Maytenus ilicifolia*.

Figueiredo (2006) isolou de *Maytenus ilicifolia* fungos endofíticos e os avaliou quanto ao potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas em humanos e o fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta do Citros. Os extratos metanólicos de dois isolados exibiram ação fungistática na germinação e no crescimento micelial de *G. citricarpa*. Dois extratos de *Pestalotiopsis* sp. inibiram o crescimento dos microrganismos-teste (*S. aureus* oxalino resistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*).

Bactérias com potencial anti-leucemico foram isoladas de *Maytenus*, essas bactérias interagem com as plantas na produção de alguns metabólitos, como a maytensina, substância que também apresenta propriedades antifúngicas.

Azevedo *et al.* (2000) relataram a presença de bactérias endofíticas em folhas de *Maytenus aquifolium*. Foram isolados vinte gêneros, os mais frequentes foram *Bacillus*, *Clavibacter* e *Streptomyces*, além de actinomicetos. Testes preliminares mostraram que algumas das bactérias podem produzir ansamacrolídeos, que também são produzidos pela planta hospedeira.

### 3.6 *Guignardia citricarpa* Kiely e a Mancha preta do citros

O gênero *Guignardia* foi descrito em 1982 por Viala e Ravaz, e compreende as formas teleomórficas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros

relacionados de fungos imperfeitos geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984).

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente saudáveis, descrevendo-as como endofíticas (CARROLL e CARROLL, 1978; PETRINI, 1986; LEUCHTMANN *et al.*, 1992; GLIENKE, 1995; PENNA, 2000). No entanto existe um grande número de relatos citando este gênero como fitopatogênico de diversas culturas com grande importância econômica como arroz (SUGHA, SINGH E SHARMA, 1986), cana-de-açúcar (PONS, 1990), tabaco (PATEL *et al.*, 1988) e eucalipto (CROUS *et al.*, 1993) e também frutíferas como abacate e tomate (BAKER, 1938), manga e mamão (McMILLAN JR., 1986), uva (IBRAHIM e BAYCA, 1989), e principalmente em citros (McONIE, 1964a, 1964b; HERBERT e GRECH, 1985; JOHNSTON e FULLERTON, 1988).

O fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa* (McALP.) Van Der Aa) é um Ascomiceto da ordem Dothideales, família Dothideaceae. Possui estroma plectenquimatoso, pseudotécio globoso a subgloboso medindo 125 a 360 µm de diâmetro contendo um poro de 14 a 16 µm e paredes espessas com 20 a 22 µm. Seu asco apresenta forma de clava, arredondado na extremidade superior e é bitunicado. Contém oito ascósporos unicelulares, hialinos, ligeiramente cinzentos, rombóides, contendo grânulos e um grande vacúolo central. Os ascósporos são cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades. Segundo Sivanesan (1984) pseudoparáfises são encontradas em pseudotécios maduros. De acordo com Johnston e Fullerton (1988), as formas anamorficas e teleomorfa geralmente são encontradas associadas.

As estruturas de frutificação são os picnídios, que macroscopicamente são pequenos, globosos, pretos e semi-eruptivos. A fase sexuada corresponde à produção de ascósporos, os quais se encontram em número de oito no interior dos ascos. Estes apresentam forma de clava, são arredondados na extremidade superior e bitunicados. Os ascósporos são unicelulares, hialinos, levemente acinzentados, rombóides, contendo grânulos e um grande vacúolo central, cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades (SIVANESAN, 1984).

Fialho (2004) avaliou *in vitro*, o potencial de linhagens de *S. cerevisiae* como agentes no controle biológico contra *G. citricarpa*, nos frutos pós-colheita. Rodrigues (2006) avaliou o efeito dos principais fungicidas utilizados no campo para o controle da doença. Também avaliou 96 linhagens de fungos, para a seleção de potenciais agentes no controle biológico, demonstrando que algumas espécies de *Trichoderma*, são capazes de atuar *in vitro*, como biocontroladores do fitopatógeno *G. citricarpa*.

Cardoso-Filho (2003) avaliou o uso de indutores de resistência *Saccharomyces cerevisiae*, Bion<sup>®</sup> e ácido salicílico ao fitopatógeno *G. citricarpa*. O autor destaca que os compostos presentes no albedo (mesocarpo) da laranja, como a celulose, carboidratos solúveis, pectinas, compostos fenólicos (flavonóides), aminoácidos e vitaminas podem exibir a ação antimicrobiana para o controle da MPC. Neste contexto, ele avaliou os extratos produzidos pelo albedo da laranja e comprovou ação fungicida ou fungistática, inibindo a germinação, esporulação e crescimento micelial *in vitro*, de *G. citricarpa*.

Blanco (1999) e Christo (2002) observaram esta variabilidade entre linhagens isoladas de lesão de Mancha Preta de Citros (MPC), ou seja, linhagens de *G. citricarpa*, utilizando dados de RAPD. Esta variabilidade também foi evidenciada em linhagens isoladas em plantas assintomáticas, atualmente descritas como *Guignardia mangiferae* (GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; CHRISTO, 2002; BAAYEN, *et al.*, 2002; OKANI, NAKAGIRI e ITO, 2001, RODRIGUES, *et al.*, 2004).

Em 1999, Glienke-Blanco comparou geneticamente, por meio de marcadores de RAPD, linhagens de populações patogênicas e endofíticas de *Guignardia* sp. de diversas regiões e hospedeiros, constatando a existência de três populações de *Guignardia* geneticamente muito diferentes coexistindo em citros, sendo duas endofíticas e uma patogênica, sugerindo que talvez estas três populações pudessem pertencer a espécies distintas. O desenvolvimento de um par de oligonucleotídeos capaz de amplificar um fragmento de 370 pb, específico para linhagens patogênicas de *G. citricarpa*, veio a corroborar para distinção genética entre estes grupos (GLIENKE *et al.*, 2007).

### 3.6.1 Mancha Preta do Citros

A doença mancha preta dos citros (MPC) foi descrita na Austrália em 1985 por Kiely, posteriormente na África do Sul, como consequência da importação de mudas da Austrália. Atualmente está distribuída em regiões subtropicais do mundo, entre elas o Brasil (GÓES *et al.*, 2005).

O ciclo da doença (MPC) inicia-se com a disseminação dos conídios ou picnidiósporos (esporos assexuais) e ascósporos (esporos sexuais) do fungo *Guignardia citricarpa*. Os conídios (picnidiósporos) são responsáveis pelas infecções à curta distância e estão localizados no interior dos picnídios oriundos dos frutos infectados. Um agregado de conídios emerge através da abertura do picnídio (ostíolo), dissolve-se na água da chuva, orvalho ou irrigação, e cai sobre os pequenos frutos susceptíveis que se formam após as floradas. Já os ascósporos são responsáveis pela disseminação à curta e longa distância, pois são lançados dos peritécios que se formam em folhas caídas ao solo, e são levados por correntes aéreas, infectando pequenos frutos susceptíveis (ROBES, 1990).

Em estudo epidemiológico da MPC, Spósito *et al.* (2008) analisou 27270 frutos colhidos de 303 árvores quanto à incidência da doença (porcentagem de frutos doentes por árvore) e quanto à severidade da doença (área com sintoma do fruto). O autor encontrou frutos doentes em 251 árvores das 303 analisadas (83%), com diferentes níveis de incidência. Algumas árvores tinham a maioria das frutas com lesões agregadas e de alta gravidade, enquanto outras tinham a maioria das frutas com poucas lesões e baixa gravidade. Segundo os autores, quando o agente patogênico é disperso pela água da chuva, esta pode transportar muitos esporos de uma vez, formando uma lesão. O padrão de sintomas resultantes a partir deste tipo de dispersão é tipicamente agregada. Os autores concluíram que os ascósporos são os mais importantes inóculos de *G. citricarpa*.

A MPC caracteriza-se por apresentar lesões com bordas salientes e com depressão no centro, onde se observam pequenos pontos pretos, os picnídios. As lesões podem atingir os frutos maduros ou no início de maturação, podendo aparecer

após a colheita, no transporte e armazenamento (ROBES *et al.*, 1995). A MPC afeta apenas a casca do fruto e o flavedo (epicarpo), sem causar dano internamente, limitado pelo albedo (mesocarpo). Porém, sua comercialização no mercado de frutas é prejudicada, assim como a sua exportação devido à barreira fitossanitária existente na União Européia, por ser uma doença quarentenária A1. Nos casos em que a doença atinge o pedicelo do fruto, pode ocorrer à queda prematura do fruto, aumentando as perdas na produção e até limitando seriamente a citricultura em vários estados brasileiros (GÓES *et al.*, 2005; ROBES *et al.*, 1995).

Em função dos prejuízos causados por *G. citricarpa*, na comercialização de frutos *in natura*, principalmente no mercado externo, são crescentes os estudos que dão ênfase ao controle biológico da doença.

### **3.7 O Gênero *Phomopsis* sp.**

O gênero *Phomopsis*, descrito em 1905 por (Sacc.) Bubak (RIEDL, 1981), forma picnídios escuros, com ostíolo normalmente em forma de pêra, conidióforos simples, alfa conídios hialinos com gotas nas extremidades, predominantemente elipsóides, sem septos, unicelulares de forma ovóide. Apresenta também beta conídios hialinos, sem gotas, filiformes, a maioria curvos em uma das extremidades, sem septos (HANLIN e MENEZES, 1996).

Outra característica dos fungos do gênero *Phomopsis* é a formação de linhas negras estreitas em tecidos de plantas contaminadas, assim como, no meio de cultura em que são repicados (BRAYFORD, 1990).

O gênero *Phomopsis* pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotin, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Diaporthales, família Valsaceae, mitosporic Valsaceae. Apresenta-se na forma anamórfica, o seu teleomorfo é o *Diaporthe* cujo habitat é o caule de plantas lenhosas e herbáceas (HANLIN e MENEZES, 1996).

Espécies de *Phomopsis* são comumente encontradas como patógenos e endófitos de plantas (BODDY e GRIFFITH, 1989). Tradicionalmente o gênero tem sido

considerado altamente patogênico (REHNER e UECKER, 1994), mas algumas espécies de *Phomopsis* são, entretanto, endófitos mutualísticos (WEBBER e GIBBS, 1984; CARROLL, 1986).

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

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

Wehmeyer (1933), elaborou uma revisão do gênero *Diaporthe*, o autor considerou a associação com o hospedeiro uma característica de menor importância, tendo reduzido de 650 para 70 o número de espécies no gênero. No entanto, este estudo baseou-se unicamente em características morfológicas do teleomorfo não tendo sido consideradas as características do anamorfo.

A delimitação de espécies de *Phomopsis* baseado apenas em características morfológicas demonstrou-se inadequada (VAN DER AA, 1990). Em adição as características de morfologia do conídio e características da colônia usadas para identificar espécies, alguns autores têm utilizado caracteres alternativos que incluem virulência (VIDIC, 1991), proteínas e sorologia (LEE e SNOW, 1992; VELICHETI *et al.*,



1991), seqüências ITS (ZHANG *et al.*, 1998) e enzimas e metabólitos secundários (SHIVAS, ALLEN e WILLIAMSON, 1991). Infelizmente, nenhum caráter foi aplicável para distinguir todos os grupos de isolados (REHNER e UECKER, 1994).

O entendimento sobre o gênero expandiu-se por meio de estudos de seqüências ITS, nos quais alguns dos isolados agruparam-se por regiões geográficas (REHNER e UECKER, 1994). Alguns trabalhos têm comparado dados morfológicos com dados moleculares, principalmente o uso de seqüências da região ITS do DNA ribossomal. Zhang *et al.* (1998) distinguiu cinco táxons de *Phomopsis* isolados de Soja (*Glycine max*) utilizando seqüências da região ITS do DNA ribossomal, porém não foram capazes de diferenciar-los com base nas características morfológicas. Farr *et al.* (2002) caracterizaram por análise molecular, com o uso de seqüências ITS1, 5,8S, ITS2 e por características morfológicas, linhagens de *Phomopsis* sp. isolados de *Vaccinium corymbosum* e *V. macrocarpon*. Baseados nesse estudo, verificaram que a maioria dos isolados tratava-se de *Phomopsis vaccinii*, uma vez que as seqüências agruparam-se com uma cultura referência dessa espécie.

Castlebury e Mengistu (2006) avaliaram *Phomopsis* isolados de soja e outros hospedeiros combinando dados de seqüências de ITS do DNA ribossomal, o seqüenciamento do gene EF1-alpha e genes de actina, seis grupos de *Phomopsis* foram formados, desses, três correspondem aos táxons: *P. longicolla*, *Diaporthe melonis* e *D. phaseolorum*. Os autores concluíram então, que à ausência de distinção morfológica e informação biológica torna problemática a identificação de espécies aos grupos de isolados geneticamente distintos. Além disso, não está esclarecida a importância biológica e genética dos diferentes grupos e trabalhos adicionais quanto aos hospedeiros, patogenicidade e morfologia são necessários para resolver a distinção de espécies neste gênero.

O gênero *Phomopsis* é um importante grupo de fungos com potencial biotecnológico, devido à produção de importantes metabólitos secundários, entre os quais se incluem as micotoxinas que afeta o sistema nervoso de vertebrados (BILLS *et al.*, 2002), alcalóides com capacidades farmacológicas, tais como phomopsins (COCKRUM, PETERSON e EDGAR, 1994) e 2,4-diidroxí-5,6-dimetil benzoato de etila

e phomopsilactona, produzidos por *Phomopsis cassiae* endofítico de *Cassia specatabilis* (SILVA *et al.*, 2005).

### 3.8 Marcadores Moleculares

A variabilidade genética em microrganismos pode ser detectada por técnicas clássicas ou moleculares. As técnicas clássicas baseiam-se na análise de fenótipos a partir da caracterização morfológica (produção de conídios, crescimento radial da colônia), ou bioquímica (produção de substâncias, auxotrofias), restringindo a possibilidade de se conduzir estudos populacionais e muitas vezes, de sistemática. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas para evidenciar e entender melhor diversos aspectos relacionados direta ou indiretamente com o DNA. Desta forma, a análise dos ácidos nucléicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de organismos e no esclarecimento taxonômico e filogenético dos organismos estudados.

Os diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de ácidos nucléicos têm permitido a análise molecular da variabilidade do DNA, determinando pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares”. Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, ou de um segmento específico de DNA (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998).

Os dados moleculares freqüentemente complementam e corroboram hipóteses baseadas em estudos morfológicos, embora, algumas vezes os resultados obtidos da análise de DNA sejam conflitantes com dados de análise exclusivamente fenéticas. Esta contradição pode ser observada principalmente na classificação taxonômica de microrganismos (SAMUELES e SEIFERT, 1995).

Algumas técnicas moleculares utilizadas principalmente em fungos para a detecção do polimorfismo genético de seqüências de DNA são: Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), Polimorfismos dos fragmentos de Restrição (RFLPs), Polimorfismos

do DNA Amplificados ao Acaso (RAPDs), Seqüenciamento das Regiões Internas Transcritas (ITS1 e ITS2) do DNA ribossômico (rDNA).

Além de avaliarem a variabilidade genética, estes marcadores moleculares podem determinar relações filogenéticas, como também colaborar na identificação de um determinado isolado. Tais marcadores podem ser gerados independentemente do fenótipo e revelar polimorfismos altamente informativos em seqüências de DNA.

A técnica de RFLP surgiu a partir da descoberta de que os sítios para enzimas de restrição poderiam ser polimórficos, ou seja, alterações em um único par de bases, que muitas vezes são neutras, poderiam ser detectadas pela presença ou ausência destes sítios para endonucleases. Esta técnica propiciou a introdução de um elevado número de marcadores moleculares nas análises de variabilidade genética (ALBERTS *et al.*, 2004). Dentre as inúmeras aplicações dos marcadores RFLP pode-se citar o estudo da evolução dos genomas; a identificação de genes específicos; o estudo de genética de populações; a taxonomia e obtenção de mapas genéticos (MICHELEMORE e HULBERT, 1987). Entretanto, seu uso torna-se limitado, pois é necessário DNA de alta qualidade e em grande quantidade (GLIENKE, 1995).

O uso do DNA ribossomal (rDNA) como marcador molecular, também pode ser empregado na análise da variabilidade genética, para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. As seqüências codificantes do rDNA evoluem muito lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Ao contrário do rDNA, as regiões espaçadoras internas destes genes, conhecidas como ITS, evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo desta forma, de grande interesse nos estudos filogenéticos de gêneros, espécies e populações (WHITE e MORROW, 1990).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma das mais importantes e utilizadas técnicas em Biologia Molecular, por apresentar rapidez, baixo custo e capacidade de amplificação de pequenas quantidades de DNA (MULLIS e FALOONA, 1987; WHITE e MORROW, 1989).

Concebida por KARY MULLIS em meados da década de 80, a técnica baseia-se em amplificar fragmentos de seqüências de DNA com alta especificidade e fidelidade,

utilizando oligonucleotídeos específicos ou não. Tais oligonucleotídeos delimitam a seqüência de DNA gerando um sinal molecular que pode ser amplificado (MULLIS e FALOONA, 1987; WHITE e MORROW, 1989; McPHERSON, QUIRKE e TAYLOR, 1991; GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998).

A PCR consiste em uma técnica *in vitro* capaz de produzir múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA. Alterando-se as condições de reação, pode-se amplificar cadeias simples de DNA, detectar e distinguir entre genes portadores de mutação em uma única base ou proporcionar quantidades suficientes de DNA para análise e/ou manipulação subsequente (WALKER e RAPLEY, 1999).

Uma das limitações da técnica PCR é a necessidade do conhecimento prévio da seqüência que flanqueia o segmento a ser amplificado, para que os oligonucleotídeos possam ser construídos (WATSON *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*, 2004). A técnica de RAPD, entretanto, não apresenta este obstáculo, pois segundo Williams *et al.* (1990) esta técnica baseia-se na amplificação de segmentos de DNA por um único oligonucleotídeo de seqüência arbitrária que amplifica várias regiões simultaneamente.

### **3.8.1 Marcadores RAPD**

O RAPD (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso), envolve a utilização de oligonucleotídeos de seqüência arbitrária que amplificam várias regiões do genoma simultaneamente (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH E MCCLELLAND, 1990; VILARINHOS *et al.*, 1995; FUNGARO *et al.*, 1996; ALZATE-MARIN *et al.*, 1997; ABBASI *et al.*, 1999; PAAVANEM-HUHTALA, AVIKAINEM e YLI-MATTILA, 2000). Dessa forma, não é necessário o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse.

A técnica de RAPD utiliza o mesmo princípio da PCR (SAIKI *et al.*, 1985). A principal diferença entre a PCR usual e o RAPD está na reação de amplificação, que utiliza apenas um único oligonucleotídeo, com seqüência arbitrária de 10 a 15 bases. A amplificação somente ocorre se este oligonucleotídeo for complementar a um sítio em uma das fitas, e complementar a um mesmo sítio (orientação invertida) na outra fita de

DNA (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998). Segundo Williams *et al.* (1993), o tamanho ideal do oligonucleotídeo para amplificação de RAPD é em torno de dez bases, devendo seu conteúdo GC ser em torno de 50 a 70%, e no mínimo de 40%. Além disso, os oligonucleotídeos não devem conter seqüências palindrômicas, a fim de evitar o autopareamento.

Os marcadores RAPD têm sido amplamente utilizados para o estudo de diversos grupos de seres vivos. A partir dos marcadores moleculares clonados e seqüenciados, há a possibilidade de sintetizar oligonucleotídeos específicos, aumentando o seu poder de resolução (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998).

Esses marcadores permitem caracterizar e avaliar o grau de similaridade genética entre genótipos em níveis inter e intraespecíficos, sendo altamente sensíveis quanto diferenças de até um único nucleotídeo entre o oligonucleotídeo e o DNA molde. Permitem, ainda, analisar a estrutura genética de populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica, a localização de genes de interesse econômico, e ainda a obtenção de novos marcadores para diagnósticos via PCR (FUNGARO e VIEIRA, 1998; FUNGARO, 2000; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; ANCHORENA-MATIENZO, 2002).

Diferentes níveis taxonômicos podem ser inferidos através de marcadores RAPD, cujos padrões podem apresentar-se como variáveis, quando polimórficos, e constantes, quando não-polimórficos.

Avaliando a variabilidade genética de organismos geneticamente relacionados, diversos autores confrontaram resultados obtidos a partir de análises moleculares ao nível de proteínas com os dados obtidos a partir de marcadores moleculares de DNA. Meijer, Megnegneau e Linders, (1994) estudando linhagens de *Phomopsis subordinaria*, isoladas de 23 localidades diferentes, chegaram a resultados conflitantes obtidos por RAPD e isoenzimas. Os marcadores de RAPD mostraram alta similaridade entre 47 linhagens de *P. subordinaria* isoladas de oito localidades diferentes, enquanto a análise por isoenzimas sugeriu que todas as linhagens eram idênticas.

Já Pioli *et al.* (2003) caracterizaram, por RAPD, isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* coletados de soja, na Argentina. Eles foram separados em quatro

grupos (i) *Diaporthe phaseolorum* variedade meridionalis, (ii) *D. phaseolorum* variedade caulivora, (iii) *D. phaseolorum* variedade sojæ, and (iv) *Phomopsis longicolla*, revelando a existência de variabilidade entre isolados da mesma variedade.

Fernandez e Hanlin (1996) obtiveram resultados concordantes entre a análise molecular por RAPD e as características morfológicas, separando os isolados coletados de soja em dois grupos: *Diaporthe phaseolorum* e *Phomopsis longicolla*.

Os marcadores de RAPD também podem ser usados na análise de recombinantes obtidos por parameiose em *Beauveria bassiana* (DALZOTO *et al.*, 2003).

A técnica RAPD também é utilizada como um método eficiente na diferenciação de microrganismos patogênicos e não patogênicos. Guthrie *et al.* (1992) e Vasconcelos (1994) caracterizaram diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* diferenciando-as quanto à sua patogenicidade.

Grajal-Martin, Simon e Muehlbauer (1993) conseguiram diferenciar o tipo 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* de três outros grupos por marcadores RAPDs. Da mesma maneira, isolados patogênicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* que atacam cravos, puderam ser distinguidas de vários não patogênicos por marcadores RAPD (MANULIS *et al.*, 1993).

Blanco (1999), utilizando seis oligonucleotídeos de RAPD confirmou a existência de três populações distintas de *Guignardia citricarpa* coexistindo em citros, sendo duas endofíticas e uma patogênica, responsável pelas lesões da mancha preta nos citros. Glienke-Blanco *et al.* (2002) utilizando sete oligonucleotídeos de RAPD, encontraram alta variabilidade genética em linhagens endofíticas de *Guignardia citricarpa*, isoladas de plantas assintomáticas de citros.

### 3.8.2 Marcadores ITS

O DNA ribossômico contido nas regiões organizadoras de nucléolos (NOR), tem sido objeto de um grande número de estudos, com diversas aplicações em genética, evolução e melhoramento. Tal interesse está diretamente relacionado à estrutura destas regiões, que se encontram em locais específicos do genoma, e repetidos em

seqüência inúmeras vezes. A função do rDNA é codificar as diferentes moléculas de RNA ribossômico (GRATTAPAGLIA e FERREIRA, 1998).

Segundo White *et al.* (1990), as regiões espaçadoras internas do DNA ribossomal (ITS), evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, ao contrário do rDNA e sendo assim, essas regiões são de grande interesse nos estudos filogenéticos em níveis de gênero, espécies e populações. Esta característica permite, ainda, a sua utilização na obtenção de polimorfismos de comprimento de fragmentos (RFLP) nos loci de rDNA. O número de cópias de uma determinada seqüência de rDNA, e variações de nucleotídeos nestas seqüências, também têm sido utilizados em tais estudos (FERREIRA, 1994).

O'donnell e Gray (1995) avaliaram a relação filogenética e a variação genética dentro de 24 isolados do complexo *Fusarium solani*, por meio da seqüência de rDNA e marcador RFLP e concluíram que esta espécie é formada por espécies filogenéticas distintas. Utilizando a mesma técnica, Ouellet e Seiffert (1993) diferenciaram *F. graminearum* de outras 11 espécies que atacam trigo, além de terem permitido a identificação de diversas raças desta espécie, provenientes de isolados morfológicamente semelhantes.

Jasalavich, Ostrofskf e Jellison (2000) utilizaram os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 (específico para basidiomicetos) na identificação de microrganismos. A amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 detectou a presença de basidiomicetos em diferentes amostras. Testes complementares foram realizados no produto da amplificação, por meio da técnica de RFLP, permitindo a identificação de espécie.

Satoko *et al.* (2000) e Promputtha *et al.* (2005) utilizaram a região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA para identificar fungos endofíticos que não esporularam, sendo relatados como *Phomopsis* e *Diaporthe* (anamórfico *Phomopsis*).

Farr, Castlebury e Rossman (2002) caracterizaram por análise molecular, com o uso de seqüências ITS1, 5,8S, ITS2 e por características morfológicas, linhagens de *Phomopsis* sp. isolados de *Vaccinium corymbosum* e *V. macrocarpon*. Baseados nesse estudo, verificaram que a maioria dos isolados tratava-se de *Phomopsis vaccinii*, uma vez que as seqüências agruparam-se com uma cultura referência dessa espécie.

Mostert *et al.* (2001) também usaram análise filogenética das regiões 5,8S, ITS1 e ITS2 e, DNA mitocondrial, para elucidar a taxonomia de espécies de *Phomopsis* obtidas de vinhedos. Eles observaram que os fungos endofíticos tratavam-se de *Diaporthe perijuncta* e *Phomopsis* sp táxon 1. Já os isolados patogênicos e com alta virulência pertenciam a espécie *Phomopsis viticola*, assim como os isolados descritos em estudos anteriores, como *Phomopsis* táxon 2. Eles também puderam elucidar que os isolados descritos na Austrália, como *Phomopsis* táxon 4, tratavam-se de *Libertella* sp, excluindo-o do complexo *P. viticola*.

Djaouida *et al.* (2004) sequenciaram as regiões ITS1, 5,8S e ITS2 e do gene mitocondrial *atp6* para avaliar a diversidade molecular de linhagens patogênicas contra o girassol de *Diaporthe helianthi* (anamórfico *Phomopsis helianthi*) isolados de diferentes origens geográficas.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico

#### 4.1.1 Fungos endofíticos

Quarenta e oito isolados endofíticos de *Phomopsis* spp. e um de *Diaporthe* sp. foram utilizados neste estudo (TABELA 1). Destes, oito foram cedidos cordialmente pela Dra Kátia Rodriguez e foram isolados de *Spondias mombin* (Cajazeiro), *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira) e *Aspidosperma tomentosum* (Peroba-de-campos) e dois isolados de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa) cedidos gentilmente pela Dra Sônia Pileggi. Dezessete isolados foram obtidos de amostras de folhas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira Vermelha), coletados em 2007 pelo MsC Jocinei Lima, e fazem parte do banco biológico do Laboratório de Genética de Microrganismos (LABGEM), da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. Vinte e um isolados de *Phomopsis* sp. e um isolado de *Diaporthe* sp. foram obtidos como endófitos de folhas e pecíolos de *M. ilicifolia* (espinheira santa) em quatro coletas, de outubro de 2006 a julho de 2007, no Centro Nacional de Pesquisa de Floresta (CNPFF) da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada no município de Colombo, Paraná. Dois isolados de *Phomopsis* patógenos de soja foram utilizados como linhagens referência (TABELA 1).

TABELA 1. ISOLADOS DE *Phomopsis* spp. PERTENCENTES À COLEÇÃO DO LABGEM/UFPR (CONTINUA)

<b>Código</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Procedência</b>	<b>Isolados por:</b>
SM9631	<i>Spondias mombin</i>	Redenção – Pará	Dra Kátia Rodriguez do IOC (FIOCRUZ/RJ)
SM9713	<i>S. mombin</i>	Redenção – Pará	Dra Kátia Rodriguez do IOC (FIOCRUZ/RJ)
SM9638	<i>S. mombin</i>	Redenção – Pará	Dra Kátia Rodriguez do IOC (FIOCRUZ/RJ)
SM9714	<i>S. mombin</i>	Redenção – Pará	Dra Kátia Rodriguez do IOC (FIOCRUZ/RJ)
MU0123	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Redenção – Pará	Dra Kátia Rodriguez do IOC (FIOCRUZ/RJ)
AT9810	<i>Aspidosperma</i>	Jardim Botânico do	Dra Kátia Rodriguez do

TABELA 1. ISOLADOS DE *Phomopsis* spp. PERTENCENTES À COLEÇÃO DO LABGEM/UFPR (CONTINUAÇÃO).

AT9811	<i>tomentosum</i> <i>A. tomentosum</i>	Rio de Janeiro/RJ Jardim Botânico do Rio de Janeiro/RJ	IOC (FIOCRUZ/RJ) Dra Kátia Rodriguez do IOC (FIOCRUZ/RJ)
AT9906	<i>A. tomentosum</i>	Jardim Botânico do Rio de Janeiro/RJ	Dra Kátia Rodriguez do IOC (FIOCRUZ/RJ)
ES80J	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	Dra Sônia A. V. Pileggi no LABGEM/PR
ESPAC22	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	Dra Sônia A. V. Pileggi no LABGEM/PR
A135	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A113	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A115B	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A323	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A123	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A131	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A216B	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A126	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A333B	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A134	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A132	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A333A	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A124	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A215A	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A116	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A334	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
A321	<i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba/PR	MsC Jocinei Lima/ no LABGEM/PR
ES2WF1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ES2WC1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ES2KF1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ES2NA1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor

TABELA 1. ISOLADOS DE *Phomopsis* spp. PERTENCENTES À COLEÇÃO DO LABGEM/UFPR (CONTINUAÇÃO).

ES2AB1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESBA1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESDF1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESFF1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESFH1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESFB2	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESGA1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESGF1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESIE1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESIA1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESJH1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESJD1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESJG1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESJE1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESJE2	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESKD1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESRD1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
ESSD1	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Colombo/PR	O autor
PHO1 ( <i>Phomopsis longicolla</i> )*	<i>Glycine max</i> (L.) Merr	Mato Grosso	Dr. Álvaro Almeida EMBRAPA/Londrina-PR
PHO19*	<i>Glycine max</i> (L.) Merr	Roraima	Dr. Álvaro Almeida EMBRAPA/Londrina-PR

FONTE: O autor

NOTA: \* patógenos de soja.

#### 4.1.2 Microrganismos usados para teste de antagonismo

Para determinar a atividade antimicrobiana dos isolados, foram utilizadas as seguintes linhagens teste: *G. citricarpa*, linhagens PC13/96 e PC33/05 pertencentes ao banco biológico do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná.

#### 4.1.3 Fungos endofíticos utilizados para análise de variabilidade genética

Como grupo externo para análise de variabilidade genética por RAPD foram utilizadas cinco linhagens de *Pestalotiopsis* sp. (TABELA 2).

TABELA 2. ISOLADOS GRUPO EXTERNO PARA ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD

<b>Código</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Procedência</b>
<i>Pestalotiopsis phothiniae</i>	<i>Gustavia</i> cf. <i>elíptica</i>	Amazonia*
<i>Pestalotiopsis neglecta voucher</i>	<i>Muraya paniculata</i>	Amazonia*
<i>Pestalotiopsis vismeae</i>	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Paraná**
<i>Pestalotiopsis</i> sp 3	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Paraná**
<i>Pestalotiopsis</i> sp 11	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Paraná**

**FONTE:** O autor

**NOTA:** \* Isolado cedidos pelo Profº Dr. José Odair Pereira, da Universidade Federal do Amazonas; Isolados por Josiane Gomes Figueiredo no LABGEM/PR.

## 4.2 Meios de Cultura

### 4.2.1 Caldo MEB (Extrato de Malte)

Extrato de Malte	20g
Glicose	20g
Peptona	1g
Água destilada	p/1000mL

O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Adicionou-se o ágar.

#### 4.2.2 Meio AV (Aveia-Ágar)

Aveia	30,0 g
Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000mL

A aveia foi fervida durante 30 minutos com metade do volume da água. A suspensão foi filtrada com gaze. Adicionou-se água para completar o volume. O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N, e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Acrescentou-se o ágar.

#### 4.2.3 Meio BDA (Meio Batata-Dextrose-Ágar)

Batata	200,0g
Dextrose	10,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000mL

As batatas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 20 minutos. Em seguida foram filtradas com gaze, adicionou-se a dextrose ao caldo e completou-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N, conforme a necessidade. Acrescentou-se o ágar.

#### 4.2.4 Meio MC (Meio Completo) PONTECORVO *et al.*, 1953

NaNO <sub>3</sub>	6,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5g
KCl	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g
FeSO <sub>4</sub>	0,02g
ZnSO <sub>4</sub>	0,02g
Glicose	10,0g
Peptona	2,0g
Extrato de levedura	2,0g
Caseína hidrolisada	1,5g
Solução de vitaminas	1,0mL
Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000mL

O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Adicionou-se o ágar.

#### 4.2.5 Meio MEA (Extrato de Malte) PATERSON e BRIDGE, 1994

Extrato de Malte	20g
Glicose	20g
Peptona	1g
Agar	15g
Água destilada	p/1000mL

O pH foi ajustado para 5,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Adicionou-se o ágar.

**OBS:** Todos os meios de cultura foram autoclavados durante 20 minutos a 1 atm e armazenados em temperatura ambiente.

### 4.3 Soluções e Reagentes

4.3.1 Clorofane – Fenol/Clorofórmio (1:1).

4.3.2 Clorofil – Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1).

4.3.3 Derozal Bayer® - 1mg de carbendazim em 1mL de água destilada.

4.3.4 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% (p/v) em água destilada.

4.3.5 Fenol Saturado

Um volume de fenol cristalizado foi dissolvido em banho-maria a 60°C e acrescentado um volume de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0. Após agitação por 30 minutos, a fase aquosa foi retirada e então acrescentado um volume de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0. Este processo foi repetido até atingir o pH desejado (pH 8,0). Em seguida, foi adicionado um volume final de 1/10 do tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 e estocado em frasco escuro a uma temperatura de 4°C usado após 48 horas (SAMBROOK E MANIATS, 1989).

4.3.6 Gel de Agarose 0,8% (p/v) em Tampão TBE 1x.

4.3.7 Gel de Agarose 1,5% (p/v) em em Tampão TBE 1x.

4.3.8 Lactofenol azul

Ácido láctico	20,0 g
Cristais de fenol	20,0 g
Glicerina	20,0 g

Azul de algodão (Metyl Blue Difco)	0,05 g
Água destilada	20,0 mL

Os cristais de fenol foram derretidos em banho-maria. Adicionaram-se os demais componentes. Depois de 24 horas, filtrou-se e armazenou-se em frasco escuro.

#### 4.3.9 Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com *Hind* III Gibco)

O marcador de peso molecular do DNA foi fornecido concentrado e no momento do uso, diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 1 µL do tampão da amostra: 4 µL de água Milli-Q esterilizada. Na corrida eletroforética foi utilizado 6 µL do marcador.

#### 4.3.10 Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100pb Ludwing Biotec)

O marcador de peso molecular foi fornecido concentrado e no momento do uso diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 2 µL do tampão da amostra: 7 µL de água Milli-Q autoclavada. Na corrida eletroforética foram utilizados 15 µL do marcador.

#### 4.3.11 Oligonucleotídeos (Invitrogen)

Foi adicionado Tris-HCl 10 mM pH7,0 aos oligonucleotídeos, para obter uma solução estoque com 50 µM. No momento do uso, a solução estoque foi diluída para concentração final de 4µM.

#### 4.3.12 RNase (invitrogen)

A solução foi preparada na concentração de 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 15 mM de NaCl. Aqueceu-se a 100°C por 15 minutos e estocou-se a – 20°C.



#### 4.3.13 Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido para Aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Água destilada esterilizada	p/ 100,0 mL

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenada em frasco escuro, previamente autoclavado, a 4°C.

4.3.14 Solução de NaCl 0,85% (p/v) em água destilada.

4.3.15 Solução Tween-80 0,1% (v/v) em água destilada.

4.3.16 Solução de Tetraciclina 5% (p/v) em etanol absoluto. Preparou-se a solução sob agitação e estocou-se em frasco escuro a – 20°C.

4.3.17 Solução de EDTA 0,5M em água destilada. O pH foi ajustado para 8,0 adicionando-se NaOH 1N.

4.3.18 Solução de brometo de etídio 1% (p/v) em água destilada. O brometo de etídio foi dissolvido em água destilada, agitou-se e estocou-se a temperatura ambiente, protegido de luz. No momento do uso, adicionou-se 3µL desta solução a 100 mL de tampão TBE (1X).

#### 4.3.19 Tampão TE (Tris-EDTA)

Tris-HCl pH 8,0	10,0 mM
EDTA pH 8,0	1,0 mM

#### 4.3.20 Tampão de Extração de DNA

Tris-HCl pH 8,0	200,0 mM
EDTA pH 8,0	25,0 mM
NaCl	250,0 mM
SDS (p/v)	1 %

O tampão de Extração foi preparado no momento do uso.

#### 4.3.21 Tampão da Amostra (6x)

Azul de bromofenol 3%	1,000 mL
Glicerol	1,035 mL
Água destilada	p/ 5,0 mL

#### 4.3.22 Tampão de corrida TBE 10x

Trizma base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA	4,65g
Água Milli-Q	p/ 500mL

A solução foi autoclavada e estocada a temperatura ambiente. No momento do uso, diluiu-se 10 vezes com água Milli-Q.

#### 4.4 Isolamento

A metodologia utilizada para o isolamento dos microrganismos endófitos foi descrita por Petrini (1991), modificada por Glienke (1995). Os diferentes órgãos da planta, temperatura de incubação, número de plantas e o de fragmentos plaqueados, estão listados na tabela 3.

TABELA 3. ÉPOCAS DO ANO, ÓRGÃOS DA PLANTA, CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO E NÚMERO DE FRAGMENTOS PLAQUEADOS NAS QUATRO COLETAS DE ENDÓFITOS DE ESPINHEIRA-SANTA

Isolamento	Época do ano	Órgão da planta	Temperatura de incubação	Número de Plantas	Número de fragmentos plaqueados
1	Outubro de 2006	Folha	28° C	20	360
2	Março de 2007	Folha	22-23° C	30	540
3	Julho de 2007	Folha	22-23° C	20	360
4	Julho de 2007	Pecíolo	22-23° C	20	160
<b>Total de fragmentos plaqueados</b>					<b>1360</b>

FONTE: O autor

Os fungos foram isolados de plantas aparentemente saudáveis, com folhas sem marcas, arranhaduras ou ferimentos. Após a coleta, as folhas foram colocadas em sacos plásticos devidamente identificados, em seguida as superfícies das folhas foram lavadas em água corrente, com auxílio de uma esponja para a remoção dos microrganismos epifíticos e outros contaminantes. Os pecíolos foram vedados com parafina derretida, para evitar a entrada dos desinfetantes nos seus tecidos internos, desta forma preservando os endófitos a serem isolados. As folhas vedadas foram mergulhadas em frascos com água destilada autoclavada, sendo mantidos por 1 minuto, em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 6 minutos, etanol 70% por 30 segundos e por último, em água destilada autoclavada por 6 minutos. Devido à dificuldade de isolar fungos do gênero *Phomopsis* nos isolamentos 1 e 2 foi reduzido o tempo de tratamento com hipoclorito de sódio para 4 minutos nos isolamentos 3 e 4 (TABELA 3). As folhas foram cortadas em seis fragmentos de 5-7 mm e os pecíolos foram cortados das folhas e oito deles foram transferidos para placas de

Petri (90 mm) contendo os meios de cultura BDA, adicionados de Tetraciclina (10 mg/mL), para impedir o crescimento bacteriano (ARAUJO *et al.*, 2002).

Como controle, após o processo de desinfestação, foram inoculados 0,1 mL da última água autoclavada utilizada no tratamento, em três placas de Petri. As placas permaneceram incubadas nas mesmas condições do isolamento.

#### **4.5 Conservação dos fungos**

Os isolados foram estocados utilizando-se duas metodologias: 1) em frascos contendo meio de cultura BDA inclinado, após sete dias de crescimento a 28°C foram mantidos a 4°C, realizando-se repiques mensalmente; 2) em frascos contendo água destilada esterilizada com 12 discos de 5 mm meio de cultura BDA contendo micélios. Repetiu-se o procedimento a cada três meses.

#### **4.6 Caracterização morfológica**

A caracterização macromorfológica dos isolados de *Phomopsis* foi realizada com base na forma dos bordos, crescimento micelial, aspecto da colônia e a sua coloração no verso e reverso da placa em diferentes meios de cultura. Discos de micélio (8 mm) provenientes de colônias de *Phomopsis*, com sete dias de crescimento em meio de cultura BDA, foram inoculados no centro de placas de Petri com diferentes meios de cultura: Batata-dextrose-ágar (BDA), aveia-ágar (MAV) e extrato de malte-ágar (MEA). Foram incubados durante 14 dias, a 22°C, sob luz contínua. Os ensaios foram realizados em triplicata. O diâmetro das colônias foi medido a partir do terceiro dia de crescimento até o quinto dia quando alguns atingiram completamente as bordas da placa de Petri.

Para análise da micromorfologia foram avaliados os conídios após 21 dias de crescimento. Os picnídios foram comprimidos entre a lâmina e a lamínula, com uma gota de lactofenol azul de algodão, possibilitando a observação ao microscópio óptico

com aumento de 1000x. O comprimento e largura dos conídios foram medidos usando uma régua na objetiva com escala de 1 $\mu$ M.

#### **4.7 Obtenção de colônia monospórica**

Após os isolados terem sido identificados como pertencentes ao gênero *Phomopsis*, colônias monospóricas foram obtidas, cultivando os isolados endofíticos em placas de Petri com meio BDA a 28°C. Observou-se o crescimento da colônia e monitorou-se com observação em microscopia óptica a produção de esporos. Os picnídios foram coletados e macerados em solução de “Tween 80” 0,1%. A suspensão de esporos foi filtrada com seringas contendo lã de vidro. Em seguida, adicionou-se 10 mL de solução salina. Centrifugou-se a solução filtrada durante 4 minutos a 7000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 400  $\mu$ L de solução salina para suspender o precipitado onde ficaram contidos os esporos, retirou-se 10  $\mu$ L desta suspensão sendo a concentração estimada em Câmara de Neubauer. Quando necessário, diluiu-se em solução salina para viabilizar a contagem dos esporos. Foram semeados 100  $\mu$ L de suspensão em uma placa de Petri contendo meio BDA, espalhou-se com alça de Drigalsky, incubou-se a 28°C. Colônias isoladas foram selecionadas e repicadas em tubos com BDA inclinado que após crescimento por sete dias a 28°C foram mantidos a 4°C.

#### **4.8 Caracterização Molecular**

##### **4.8.1 Extração do DNA (RAEDER e BRODA, 1985; modificado por GLIENKE, 1995)**

O DNA genômico foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985), modificada por Glienke (1995). Os isolados endofíticos de *Phomopsis* foram cultivados em meio MEA durante cinco dias a 28°C. O micélio obtido a partir da raspagem da colônia com espátula esterilizada foi liofilizado e mantido em freezer ou na

seqüência macerados com adição de nitrogênio líquido. O material foi pesado e para cada grama de micélio, acrescentou-se 1 mL de Tampão de Extração. Incubou-se a solução homogeneizada durante 20 minutos em banho-maria a 70°C. Acrescentou-se um volume de fenol saturado, misturaram-se as fases e centrifugou-se durante 15 minutos a 5000 rpm. Coletou-se a fase aquosa, colocou-se em um novo tubo e adicionou-se a este um volume de Clorofane. Centrifugou-se novamente, sob as mesmas condições anteriores. Coletou-se a fase aquosa, como na etapa anterior e adicionou-se um volume de Clorofil, repetindo-se o processo de centrifugação, sob as mesmas condições. Coletou-se a fase aquosa em um novo tubo e adicionou-se etanol absoluto. O material foi incubado a – 20°C, durante uma hora. Após este período, a suspensão foi centrifugada (10000 rpm por 20 min.), desprezou-se o sobrenadante. Acrescentou-se 500 µL de etanol 70%, centrifugou-se a 10000 rpm, durante 5 minutos, descartou-se o álcool 70%, inverteu-se o tubo sobre uma folha de papel absorvente para secar a borda do tubo e este secou a uma temperatura de 37°C, durante 30 minutos. Ressuspendeu-se o DNA com 200 µL de água milli-Q por uma hora temperatura ambiente. As amostras foram tratadas RNase (30 µg/mL) a 37°C por uma hora.

A concentração de DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando como padrão de peso molecular o DNA do fago λ (Gibco) clivado com *HindIII* com concentração conhecida. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, observado sobre transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

#### **4.8.2 RAPD**

As soluções foram realizadas de acordo com as condições descritas por Glienke-Blanco *et al.* (2002), onde foram utilizados 50ng de DNA, tampão PCR 1x, 0,5U de *Taq* polimerase, 0,2mM de oligonucleotídeos, 0,2mM de dNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 25µL. Foi realizada uma prévia seleção usando-se os oligonucleotídeos

da linha OPX11 (5' TCACCACGGT 3'), OPX14 (5' TCACCACGGT 3'), OPX19 (5' TCACCACGGT 3') e OPE 08 (5' TCACCACGGT 3') da Operon Technologies®.

A amplificação foi realizada com as condições descritas por Pioli *et al.* (2003) com modificações, sendo cada reação submetida a 40 ciclos após a desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos. Cada ciclo consiste de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 35°C e 2 minutos a 72°C.

#### 4.8.2.1 Análise da Variabilidade Genética

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5%, e posteriormente corados por 20 minutos com solução de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados em um transiluminador de luz Ultravioleta e a imagem do gel documentada através de sistema fotográfico Digi-doc it. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Ladder* de 100 pb (Ludwing Biotec).

A análise da variabilidade genética foi realizada pelo agrupamento das linhagens segundo os princípios adotados em taxonomia numérica, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, que permite calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de banda). As bandas foram consideradas como variáveis enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente foi calculado segundo a fórmula  $J=M/P$ , onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos concordâncias negativas (SNEATH e SOKAL, 1973).

Desta forma, o coeficiente de similaridade Jaccard (J) leva em conta apenas as discordâncias e as concordâncias positivas, quanto à presença ou ausência de bandas, desconsiderando as concordâncias negativas. Quanto maior a semelhança entre duas linhagens, maior é o valor de similaridade. As unidades foram agrupadas através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) que é um modelo de agrupamento hierárquico, e permite a construção de dendrogramas (SNEATH e SOKAL, 1973). Matrizes e dendrogramas foram elaborados usando o software NTSYS (*Numerical taxonomy system of multivariate programs*) (ROHLF, 1988).

Para verificar a consistência dos agrupamentos verificados, foi realizada uma análise *bootstrap* segundo Felsenstein (1985) utilizando o *software* BOOD (COELHO, 2005).

#### 4.8.3 Seqüenciamento da região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA

##### 4.8.3.1 Amplificação

A reação foi realizada com os oligonucleotídeos LS266 e V9D (TABELA 4), que são universais para fungos e permitem amplificar a região ITS1, 5,8S e ITS2 do DNA Ribossomal.

TABELA 4. SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL

Oligonucleotídeos	Seqüência
LS266	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'
V9D	5'GCATTCCCA AA C AACTCGAC 3'

**FONTE:** O autor

As condições da reação foram realizadas de acordo com a descrição de White *et al.* (1990), com algumas modificações: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de *Taq* DNA polimerase, 0,8 $\mu$ M de oligonucleotídeos, 0,2mM de dNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub> para um volume final de 50 $\mu$ L.

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler Gradiente), com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72°C.



#### 4.8.3.2 Purificação da PCR

Foram testadas duas metodologias de purificação da reação de PCR.

##### 4.8.3.2.1 Purificação com PEG

Aos produtos da amplificação da PCR com os oligonucleotídeos LS266 e V9D, foram acrescentados 50µL de PEG os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos, em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 14000rpm. O sobrenadante foi descartado com micropipeta. Adicionou-se 125µL de Etanol 80% gelado, após 1min os tubos foram centrifugados por 2 min a 13000 rpm, descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados 125µL de Etanol 96% (gelado), descartou-se o sobrenadante, O Etanol foi evaporado em *speed vac* por 10min a 70°C. O *pellet* foi ressuscitado em 15 µL de água Milli-Q e misturado, em seguida ficou à temperatura ambiente por pelo menos 2 horas.

Para confirmação da presença do DNA na amostra, 1µL foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

##### 4.8.3.2.2 Purificação com Acetato de Amônio

Aos produtos da amplificação da PCR com os oligonucleotídeos LS266 e V9D, foram acrescentados 34 µL de acetato de amônio (AcNH<sub>4</sub>) 7,5M e 100 µL de etanol 96%. Os tubos ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 14000rpm. Os *pellets* resultantes foram lavados com 250 µL de etanol 70% (recém preparado), centrifugou-se por 15 minutos a 14000rpm e descartou-se o etanol. O *pellet* foi seco na estufa a 37°C por 30 mim e ressuscitados em 15µL de água Milli-Q.

Para confirmação da presença do DNA na amostra, 1µL foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%.

#### 4.8.3.3 Reação de Seqüenciamento

Foram realizadas três reações de seqüenciamento, a primeira foi realizada usando o produto tratado com PEG, e nas duas posteriores usou-se o produto de PCR tratado com acetato de amônia. Para o restante da metodologia não houve alteração.

O seqüenciamento da região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger *et al.* (1977), utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em Seqüenciador Automático de DNA megaBACE.

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados cerca de 50ng da reação de PCR purificada, 0,2 µM do oligonucleotídeo ITS1 (TABELA 5) e 4µL de mistura para seqüenciamento ET (Kit: “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE” da Amersham Biosciences), completando com água milli-Q para um volume final de 10µL. As mesmas condições foram aplicadas para o oligonucleotídeo ITS4 (TABELA 5).

TABELA 5. SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL

<b>Oligonucleotídeos</b>	<b>Seqüência</b>
ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'
ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'

**FONTE:** O autor

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler Gradient), seguindo uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 1 minuto e 5 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C, 20 min a 8°C.

#### 4.8.3.4 Purificação da Reação de Seqüenciamento

Foram testadas três metodologias de purificação da reação de seqüenciamento.

##### 4.8.3.4.1 Purificação com Isopropanol em tubos

Ao produto da reação de seqüenciamento realizado com produto de PCR purificado com PEG (item: 3.8.3.2.1) foram adicionados 40  $\mu$ L de isopropanol 75%, sendo precipitados por um *spin down*. As amostras ficaram à temperatura ambiente por 20 minutos, em seguida foram centrifugadas por 25 minutos a 13000 rpm, e o isopropanol foi removido por inversão dos tubos. Foram adicionados 200  $\mu$ L de etanol 70% não gelado e centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm, em seguida o etanol foi removido com auxílio de uma micropipeta e foi submetido a secagem em *speed vac* por 45 minutos a 60°C.

Após esse tratamento, cada amostra foi ressuspendida em 10  $\mu$ L *Loading Solution* e, submetida à eletroforese em Seqüenciador Automático de DNA modelo megaBACE, da Amersham Biosciences. Com os seguintes parâmetros: voltagem de injeção: 2V; tempo de injeção: 80 segundos; voltagem da corrida: 8V por 160 minutos.

##### 4.8.3.4.2 Purificação com Isopropanol em placa

Ao produto da reação de seqüenciamento realizado com produto de PCR purificado com acetato de amônio (item: 3.8.3.2.2) foram adicionados 40 $\mu$ L de isopropanol 75%, sendo precipitados por um *spin down*. As amostras ficaram à temperatura ambiente por 20 minutos, e em seguida foram centrifugadas por 50 minutos a 4000 rpm. O isopropanol foi removido por inversão da placa. Foram adicionados 100 $\mu$ L de etanol 70% não gelado e centrifugado por 30 minutos a 4000 rpm, em seguida o etanol foi descartado por inversão da placa seguido de um *spin* a 300 rpm por 1 minuto. Em seguida a placa ficou em estufa a 37°C durante 3 minutos.

Após esse tratamento, as amostras foram processadas como no item anterior.

#### 4.8.3.4.3 Purificação com Acetato de Amônio

Ao produto da reação de seqüenciamento realizado com produto de PCR purificado com acetato de amônio (item: 3.8.3.2.2) foram adicionados 1 µL de acetato de amônio (AcNH<sub>4</sub>) 7,5M e 30 µL de etanol 96%. Após a homogeneização por inversão 30 vezes a placa foi centrifugada por 45 minutos a 2500 RCF a 4°C.

O sobrenadante foi descartado por inversão da placa seguido de um *spin* a 500 RCF, com a placa invertida sobre papel toalha. O *pellet* foi lavado com 100 µL de etanol 70 % (recém preparado, não gelado). Seguindo-se uma nova centrifugação a 2500 RCF por 45 minutos, e o sobrenadante foi descartado por inversão da placa seguido de um *spin* a 750 RCF, com a placa invertida sobre papel toalha. Em seguida a placa ficou em estufa a 37°C durante 3 minutos.

Após esse tratamento, cada amostra foi ressuspensa e tratada como nos itens anteriores.

Todos os procedimentos, desde a reação de seqüenciamento, foram realizados sob proteção de luz direta, cobrindo a placa com papel alumínio.

#### 4.8.3.5 Edição e Análise das Seqüências

As seqüências foram então alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL-W versão 1.7 (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994) sendo realizada posterior inspeção visual através do programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999). Após a edição, alinhamento e análise prévia das seqüências, estas foram submetidas ao software MEGA 3.1 (KUMAR; TAMURA, NEI, 2004) para obtenção das árvores filogenéticas baseadas em distância. A consistência dos nós obtidos foi avaliada pelo procedimento de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 10000 reamostragens. Foram utilizadas como referências linhagens de *Phomopsis* sp., *Diaporthe* e *Pestalotiopsis vismae* (como grupo externo) depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (TABELA 6).

TABELA 6. LINHAGENS DE *Phomopsis* spp. E DE *Pestalotiopsis vismae* UTILIZADAS COMO GRUPO EXTERNO

<b>Espécie</b>	<b>Número de acesso (GenBank)</b>
<i>Diaporthe Melonis</i>	AB105147
<i>D. melonis</i>	AB105148
<i>Phomopsis longicolla</i>	AY857868
<i>P. longicolla</i>	AF000207
<i>P. camptothecae</i>	AY622996
<i>D. Phaselorum</i>	AF001024
<i>D. helianthi</i>	AJ312348
<i>D. helianthi</i>	AJ312363
<i>D. helianthi</i>	AF358441
<i>Phomopsis</i> sp. P7	DQ235673
<i>Phomopsis</i> sp. P3	DQ235669
<i>P. sojae</i>	AY050627
<i>P. chimonanthi</i>	AY622993
<i>Phomopsis</i> sp. P4	DQ235670
<i>D. conorum</i>	AB201443
<i>D. conorum</i>	DQ116551
<i>P. theicola</i>	DQ286286
<i>P. theicola</i>	DQ286287
<i>Phomopsis</i> sp. 1	AY485724
<i>Phomopsis</i> sp CBS	DQ286285
<i>Phomopsis</i> sp. Taxon 3	AF230762
<i>Diaporthe</i>	AJ312359
<i>Diaporthe</i>	AY745024
<i>Pestalotiopsis vismae</i>	EF451801

FONTE: O autor

## 4.9 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

### 4.9.1 Cultura Pareada

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos 49 isolados de *Phomopsis* sp. endofíticos (TABELA 1) contra o fitopatógeno *Guignardia citricarpa*, foi utilizado a metodologia de Cultura Pareada (MARIANO,1993). Os discos contendo micélio e/ou conídios, dos isolados endofíticos ou dos fitopatógenos ensaiados foram obtidos de

colônias crescidas em BDA, durante sete dias a 28°C, incubadas em estufa BOD e com fotoperíodo de 12 horas. Após este período foram retirados os discos da borda das colônias, com auxílio de vazador de rolhas.

Em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, colocou-se um disco (Ø 8 mm) da cultura do fitopatógeno *G. citricarpa*. Após três dias de crescimento foi adicionado, no lado oposto, um disco com o isolado de *Phomopsis* sp. endofítico a ser avaliado, ambos a 1,0 cm da borda. Após o pareamento, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas durante 14 dias em estufa BOD, com fotoperíodo de 12 h a 28°C. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. O controle recebeu apenas o fitopatógeno. A avaliação foi realizada mediante medição do diâmetro da colônia comparando com o controle e observação das interações entre as colônias.

Para determinar a porcentagem de inibição do crescimento, mediu-se o diâmetro das colônias do fitopatógeno com 14 dias de crescimento, subtraindo-se o diâmetro do inóculo original. Os cálculos foram realizados de acordo com Edginton *et al.* (1971), pela fórmula:

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

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

#### 4.9.2 Avaliação de metabólitos não voláteis

Cobriu-se assepticamente toda a superfície do meio PDA, inclusive nas bordas com discos de papel celofane (Ø11 cm) esterilizado. A seguir, foi inoculado no centro, sobre a superfície do papel celofane, discos de ágar (Ø8 mm) contendo micélio do isolado endofítico. As placas foram incubadas por quatro dias a temperatura de 28°C, as placas controles receberam apenas o fitopatógeno incubados por 7 dias, com

fotoperíodo de 12 horas. Mediu-se o diâmetro da colônia e retirou-se o papel celofane (juntamente com a colônia do isolado). Sobre a superfície de meio PDA, inoculou-se um disco de micélio do fitopatógeno a ser avaliado no centro da placa. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. As placas foram incubadas a 28°C, com fotoperíodo de 12 horas. Após 7 e 14 dias mediu-se o crescimento das colônias e comparou-se com o controle (ETHUR, CEMBRANEL e SILVA, 2001, Adaptado por Figueiredo, 2006).

### **4.9.3 Atividade dos Extratos Metanólicos**

#### **4.9.3.1 Obtenção dos extratos**

Para avaliação da atividade dos extratos metanólicos foi utilizada a metodologia descrita por Rodrigues, Hesse e Werner (2000), com algumas modificações. No processo de fermentação três discos ( $\varnothing$  8 mm) dos 49 isolados endofíticos de *Phomopsis* (TABELA 1), foram inoculados em Erlenmeyer (250 mL), contendo 100 mL de caldo extrato de malte. Incubou-se durante 7 dias (110 rpm, 28°C, fotoperíodo de 12 horas).

Após a fermentação, o micélio foi separado do líquido fermentado por filtração em papel Whatman n° 4. Ao volume do filtrado obtido, adicionou-se o mesmo volume de acetato de etila (EtOAc) (Merck) em um balão de separação. Agitou-se vigorosamente por três vezes e aguardou-se a formação de duas camadas: uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. Transferiu-se a fase orgânica para um novo recipiente, e submeteu-se a fase aquosa a mais uma extração com EtOAc. Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. Adicionou-se à fase orgânica 5% de sulfato de sódio anidro e filtrou-se novamente com papel Whatman n° 4. Obteve-se extrato bruto seco passando a fase orgânica em rotaevaporador. O extrato foi pesado e diluído em metanol (10mg/mL).

#### 4.9.3.2 Crescimento micelial

Foram obtidos discos ( $\varnothing$  12 mm) de colônias, com 14 dias de crescimento em meio completo, da cultura do fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96 ou PC33/05. Estes foram inoculados no centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA. A 1,0 cm da borda, em posição oposta foi colocado um disco de papel filtro esterilizado ( $\varnothing$  5 mm) e sobre este foram inoculados 10,0 $\mu$ L do extrato metanólico a ser avaliado. As placas foram fechadas com filme de PVC e mantidas a 28°C, fotoperíodo de 12 horas, em BOD. Avaliou-se o potencial de inibição medindo-se o diâmetro das colônias após sete dias de crescimento, comparando-se com o controle negativo onde foi inoculado água destilada autoclavada ou metanol. Como controle positivo foi utilizado fungicida Derosal<sup>®</sup> (1,0 mg/mL) (QUIROGA, SAMPIETRO e VATTUONE, 2001, adaptado por FIGUEIREDO 2006).

#### 4.10 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados com delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições. As análises de variância foram realizadas em todas as etapas do trabalho. Sempre que foi encontrado um valor significativo em relação ao teste F, completou-se a análise com teste de Tukey para comparação das médias utilizando software ASSISTAT (SILVA, 1996 e SILVA, 2002) ou o teste de Scott Knott utilizando software SISVAR (FERREIRA, 1994).



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Isolamento

Foram isolados 1005 endófitos de folhas e pecíolos de 30 plantas de Espinheira Santa (*M. ilicifolia*). Destes, 21 foram identificados a partir de análise em microscopia óptica como pertencentes ao gênero *Phomopsis*. A tabela 7 compara os resultados obtidos quanto à proporção de isolamento de *Phomopsis* sobre os diferentes tecidos da planta, nos quatro isolamentos realizados. A frequência dos isolamentos foi calculada de acordo com Souza *et al.* (2004).

TABELA 7. PORCENTAGEM DE ISOLAMENTO DE *Phomopsis* ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DE ESPINHEIRA SANTA

Isolamento	Órgão da planta	Número de fragmentos plaqueados	Endófitos Número (%)	<i>Phomopsis</i> Número (%)	Frequência isolamento <i>Phomopsis</i>
1	Folha	360	140 (39%)	0 (0%)	0%
2	Folha	540	310 (57%)	2 (0,64%)	0,37%
3	Folha	360	375 (>100%)	3 (0,8%)	0,83%
	<b>TOTAL FOLHA</b>	<b>1260</b>	<b>825 (65%)</b>	<b>5 (0,61%)</b>	<b>0,4%</b>
4	Pecíolo	160	180 (>100%)	16 (8,9%)	10,0%
<b>TOTAL</b>		<b>1420</b>	<b>1005 (71%)</b>	<b>21 (2,09%)</b>	<b>1,5%</b>

FONTE: O Autor

Observando a tabela 7, percebe-se claramente que a partir de pecíolo a frequência de isolamento de *Phomopsis* (10%) foi maior do que em folhas (0,4%), tanto em relação ao número de fragmentos plaqueados, quanto em comparação ao número total de endófitos isolados (8,9% contra 0,61%). Provavelmente devido à menor frequência de fungos filamentosos de crescimento rápido que pudessem sobrepor ao crescimento de *Phomopsis*. Segundo Souza *et al.* (2004), as folhas dos vegetais

hospedeiros são, provavelmente, as portas de entrada para os microrganismos, pois apresentam tecidos mais frágeis e expostos, pela presença de estômatos, ocorrendo posterior migração para outros tecidos da planta. O mesmo já foi relatado em espécies de *Citrus* para o isolamento de fungos do gênero *Guignardia*, sendo o pecíolo o tecido de mais fácil isolamento deste gênero, por apresentar menor colonização por *Colletotrichum* (BLANCO, 1999).

Assim, sugere-se que em trabalhos futuros de isolamento de *Phomopsis*, sejam também utilizados os pecíolos, especialmente em Espinheira Santa.

Foram também obtidos 18 isolados de *Phomopsis* de três plantas de *S. terebinthifolius* (Aroeira Vermelha), representando uma frequência de 11%. Em Aroeira a frequência do isolamento de *Phomopsis* em folha foi maior do que em Espinheira Santa em todos os isolamentos realizados.

Fungos do gênero *Phomopsis*, *Phyllosticta* e *Colletotrichum* são comumente isolados como endófitos de tecidos de diferentes espécies de plantas, em muitos casos esses fungos estão juntos num mesmo hospedeiro (PANDEY *et al.* 2003; LU *et al.* 2004).

O gênero *Phomopsis* tem sido descrito com grande frequência em isolamentos de diversas plantas (UECKER, 1988; BODDY e GRIFFITH, 1989). Azevedo *et al.* (2000) apresentaram algumas plantas hospedeiras de onde já foram isoladas espécies de *Phomopsis* entre elas, *Sabal bermudana*, *Trachycarpus fortunei*, *Cavendishia pubescens*, *Stylosanthes guianensis*, *Anacardium occidentale* e *Mangifera indica*. Corrado e Rodrigues (2004) isolaram endófitos de *Phomopsis* das plantas medicinais *Spondias mombin* e *Aspidosperma tomentosum*.

Bussabam *et al.* (2001) isolaram entre outros fungos o gênero *Phomopsis* endófitos de folhas, pseudocauls e rizomas de gengibre (*Amomum siamense* Criab), coletadas em dois locais na Tailândia. Silva *et al.* (2006) isolou *Phomopsis* como endófito de graviola (*Annona muricata* L.) e pinha (*Annona squamosa* L.).

Alguns dos relatos citam o gênero *Phomopsis* como fitopatógeno isolado de diversas espécies de *Citrus*, *Mangifera indica* (Mangueira), *Glycine max* (Soja), *Ficus carica* (Figueira) e *Anacardium occidentale* (Cajueiro) entre muitas outras plantas

(CENARGEN; EMBRAPA, 2005). Não há relatos de gênero *Phomopsis* como fitopatógeno das plantas medicinais utilizadas no presente trabalho, *Aspidosperma tomentosum*, *Spondias mombin* e *Maytenus ilicifolia*, assim como em Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius*). Entretanto, o gênero foi relatado por Anjos, Charchar e Guimarães (2001) como patógeno em culturas de Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) causando sintomas de queimas nas folhas, que consiste de uma necrose escura predominantemente nos bordos dos folíolos.

## 5.2 Caracterização morfológica de *Phomopsis*

A caracterização macromorfológica das colônias dos isolados endofíticos de *Phomopsis* sp. foi realizada de acordo com a forma dos bordos, crescimento micelial, aspecto da colônia e a sua coloração no verso e reverso da placa em diferentes meios de cultura (FIGURAS 1 a 4; ANEXO 12).

A coloração das colônias dos isolados de *Phomopsis* apresentaram elevada variabilidade, tanto no verso quanto reverso da placa, nos três meios de cultura ensaiados. Em geral variou entre combinações das cores branca, preto, verde claro e oliva, amarelo, marrom, marrom avermelhado, cinza e bege.

Os isolados de *Phomopsis* apresentaram no verso da placa com meio Aveia (AV) coloração branca, alguns isolados apresentaram combinações de branco com marrom, verde, amarelo e cinza, exceto os isolados, ESJG1, ES2KF1, ES2WF1, ESPAC22, ES80J, ESFB2, ESGF1, A134, A333B que diferiram dos demais por apresentarem coloração intensa, e o isolado A116 de coloração marrom e verde (FIGURAS 1 a 4).

Nos meios de cultura MEA e BDA observou-se que a coloração no verso da placa foi mais variável do que no meio Aveia. Igualmente, o reverso das placas contendo as colônias de *Phomopsis*, mostrou-se bastante variável entre os isolados e os três meios de cultura utilizados, havendo variação intra-individual com colorações branca, preto, verde claro e oliva, amarelo, marrom, marrom avermelhado, cinza e bege.

A morfologia micelial nos meios de cultura ensaiados variou de granuloso aéreo a algodonoso. Nos meios de cultura MEA e BDA todos os isolados apresentaram micélio denso, porém no meio AV esses dois tipos de micélio variaram de denso a ralo. A maioria dos isolados de *Phomopsis* analisados possuem micélio granuloso aéreo em todos os meios ensaiados, exceto os isolados SM9638, SM9631 e *Phomopsis longicolla* PHO1 que apresentam micélio algodonoso. Observou-se variação intra-individual na morfologia micelial entre os meios de cultura nos isolados A333B e A323 que apresentaram micélio algodonoso no meio AV e granuloso aéreo nos meios MEA e BDA. Igualmente, os isolados A123 e SM9811 apresentaram-se algodonoso no meio MEA e granuloso aéreo nos meios AV e BDA.

O aspecto dos bordos das colônias mostrou variação intra-individual entre os diferentes meios de cultura para a maioria dos isolados, exceto os isolados de *Phomopsis* SM9638, ESKD1, ESPAC22, A323, A113, A331, A115 que apresentaram bordos regulares, e os isolados SM9714, ES2WC1, ESJG1, A126, A333A, PHO1 (*Phomopsis longicolla*) e o isolado PHO19 que possuem bordos irregulares em todos os meios utilizados.

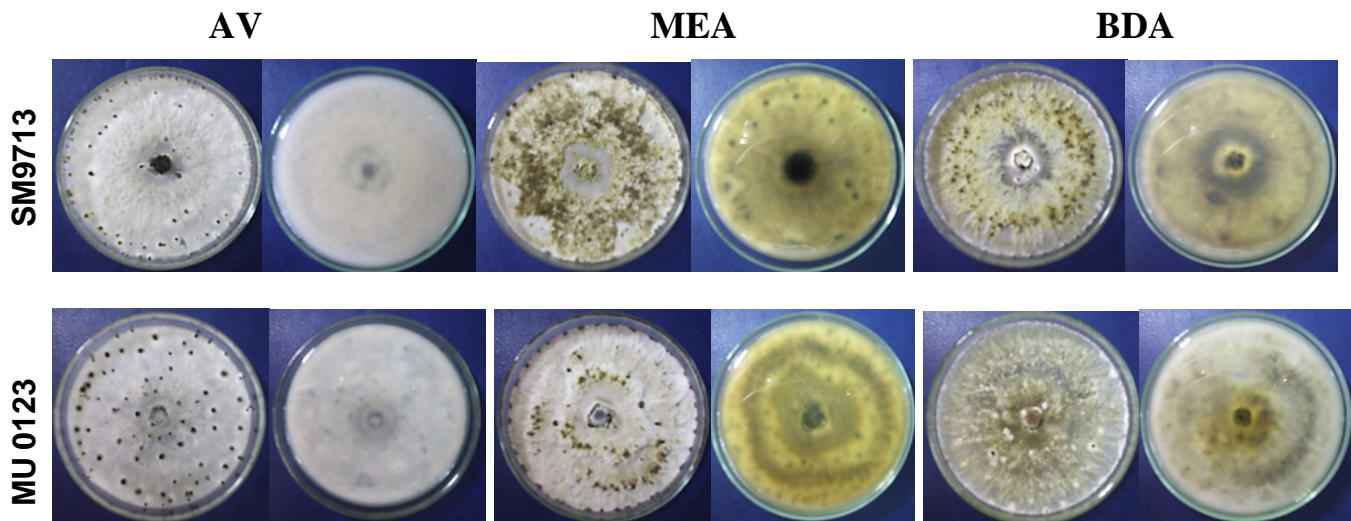


FIGURA 1. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* DE *Spondias mombin* (SM9713; SM9638; SM9714; SM9631); *Myracrodruon urundeuva* (MU0123); *Aspidosperma tomentosum* (AT9810; AT 9811 e AT 9906) EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUA)

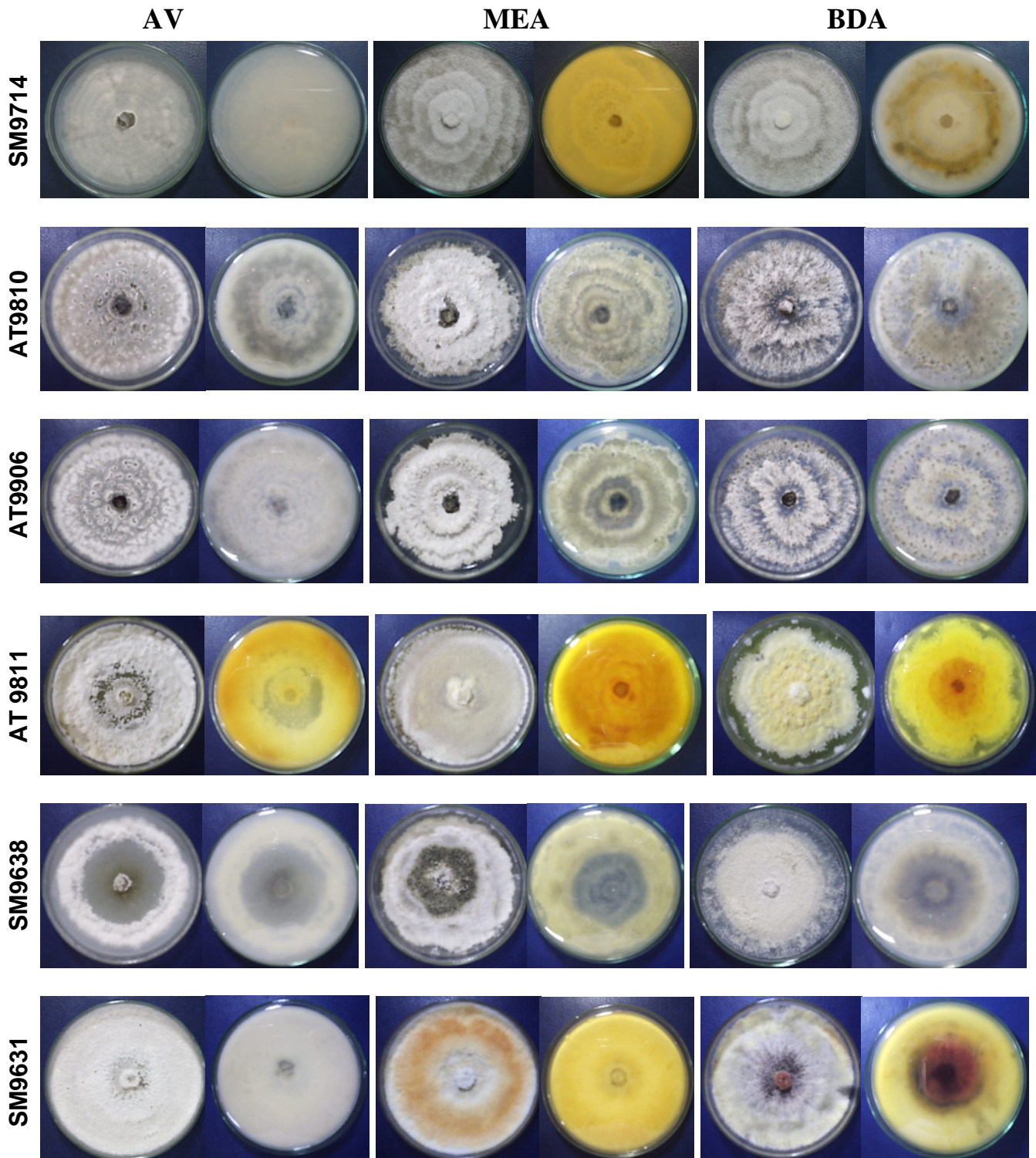


FIGURA 1. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE *Spondias mombin* (SM9713; SM9638; SM9714; SM9631); *Myracrodruon urundeuva* (MU0123); *Aspidosperma tomentosun* (AT9810; AT9811 e AT9906) EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUAÇÃO)

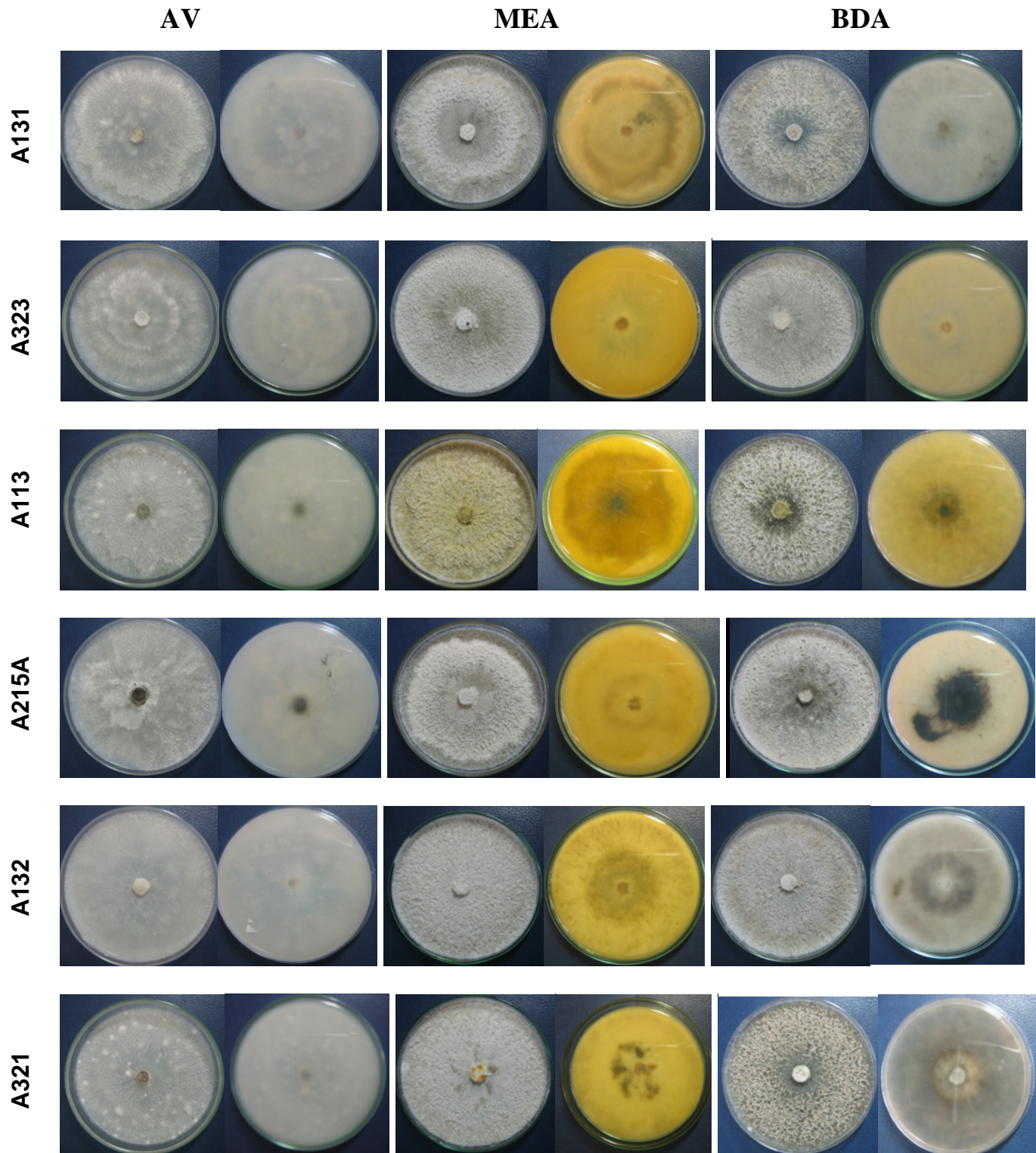


FIGURA 2. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE AROEIRA (*Schinus terebinthifolius*) EM TRÊS MEIOS DE CULTURA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUA)

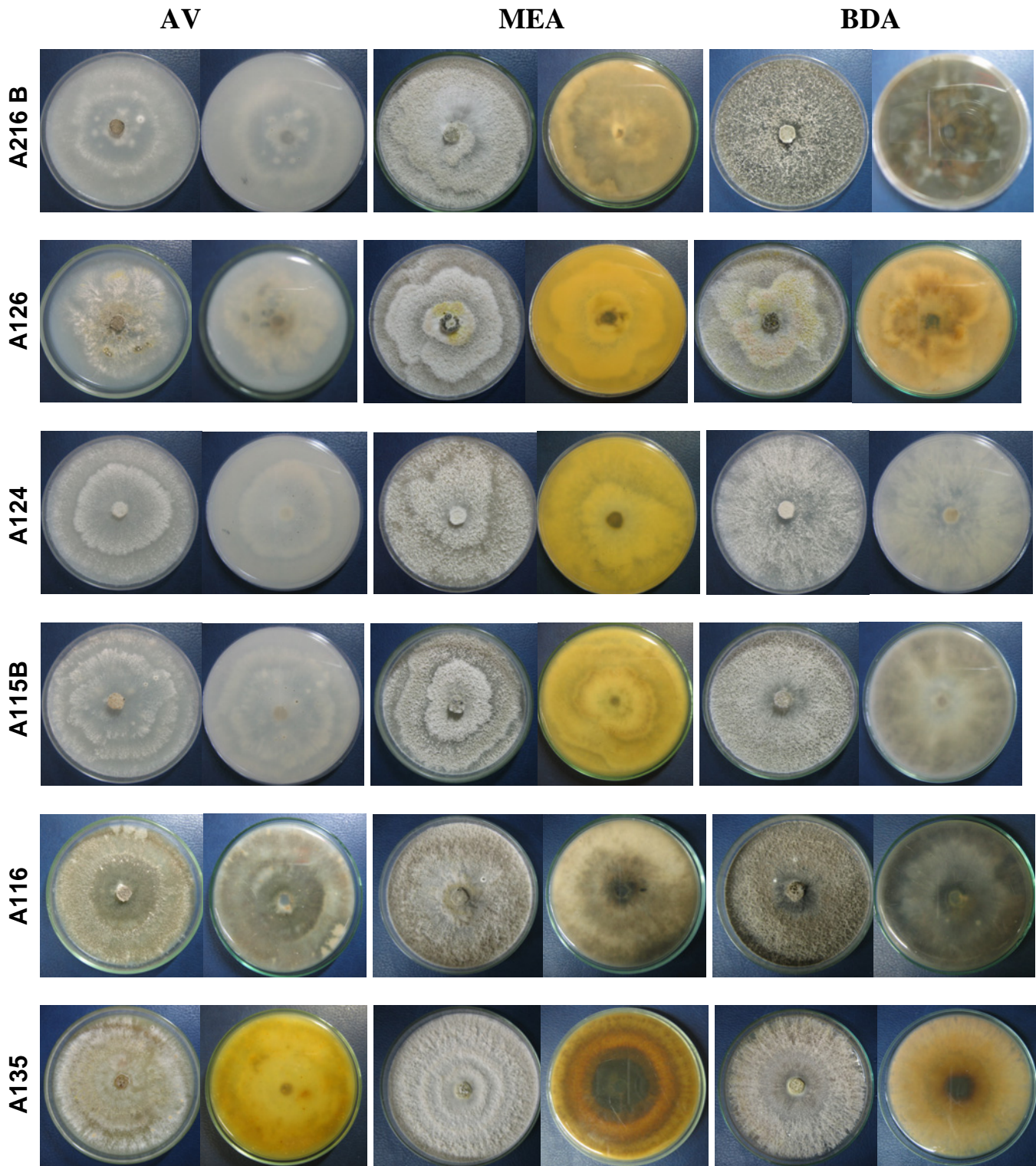


FIGURA 2. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE AROEIRA (*Schinus terebinthifolius*) EM TRÊS MEIOS DE CULTURA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUAÇÃO)

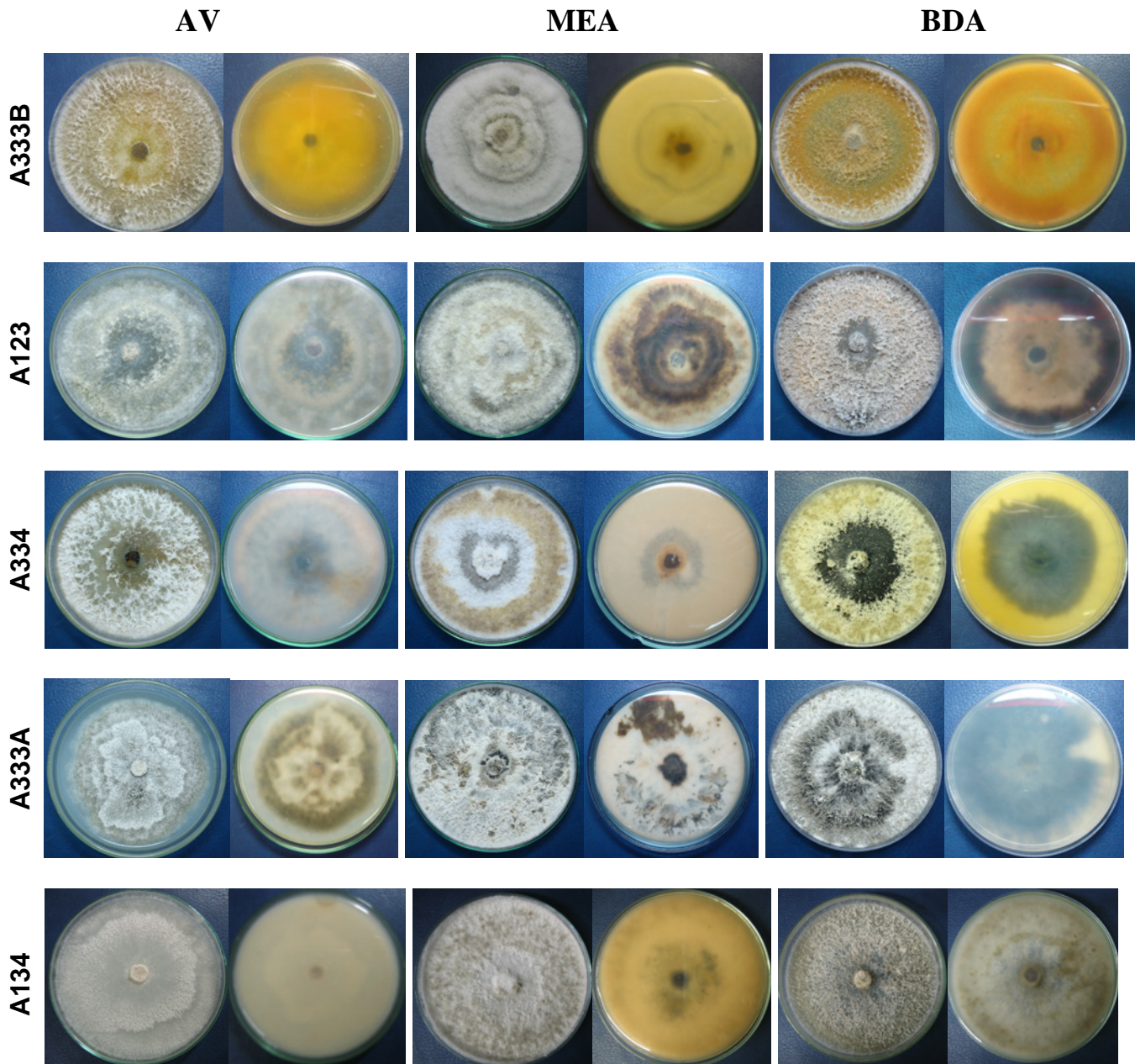


FIGURA 2. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE AROEIRA (*Schinus terebinthifolius*) EM TRÊS MEIOS DE CULTURA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUAÇÃO)



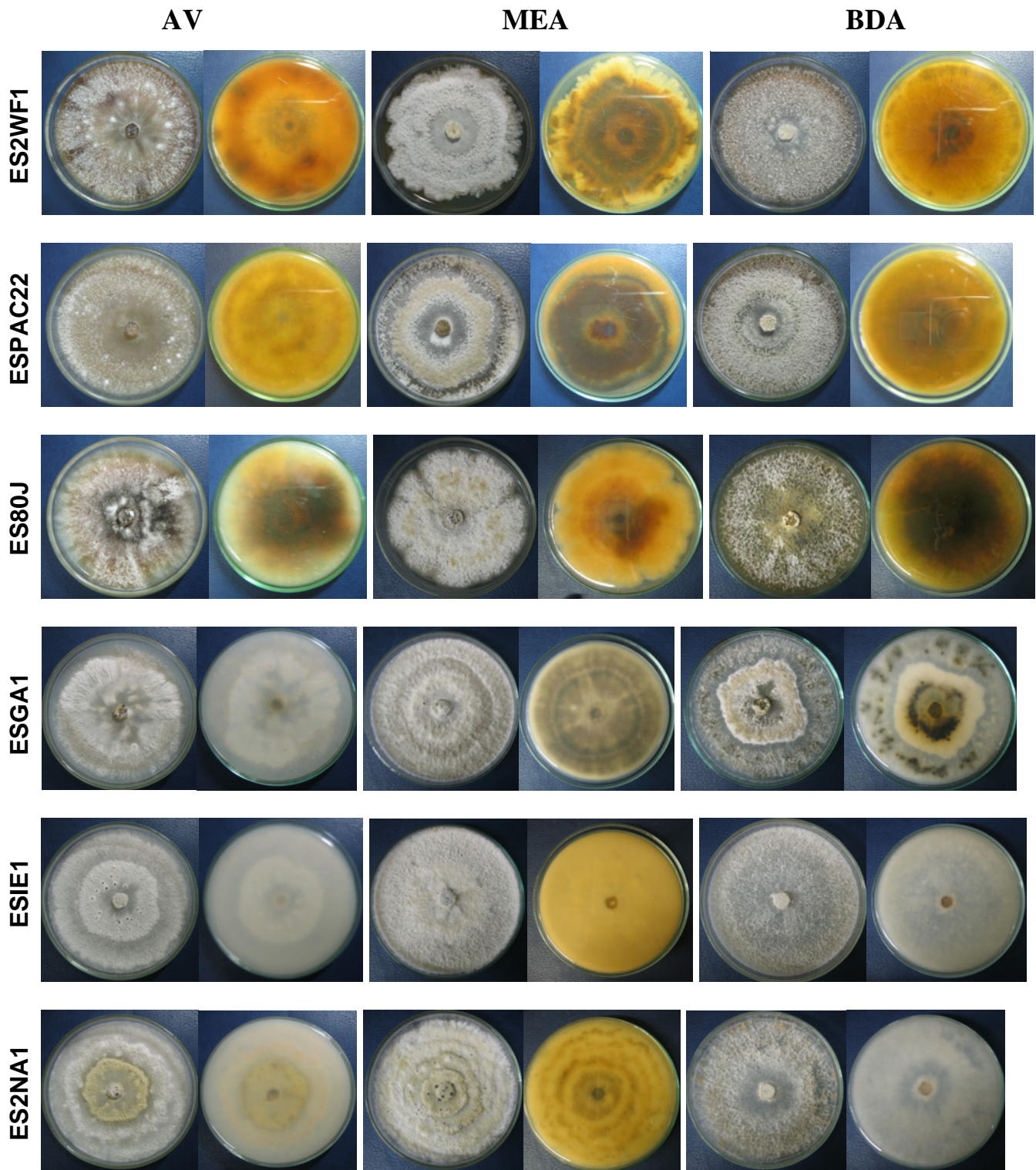


FIGURA 3. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE *Maytenus ilicifolia* EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUA)

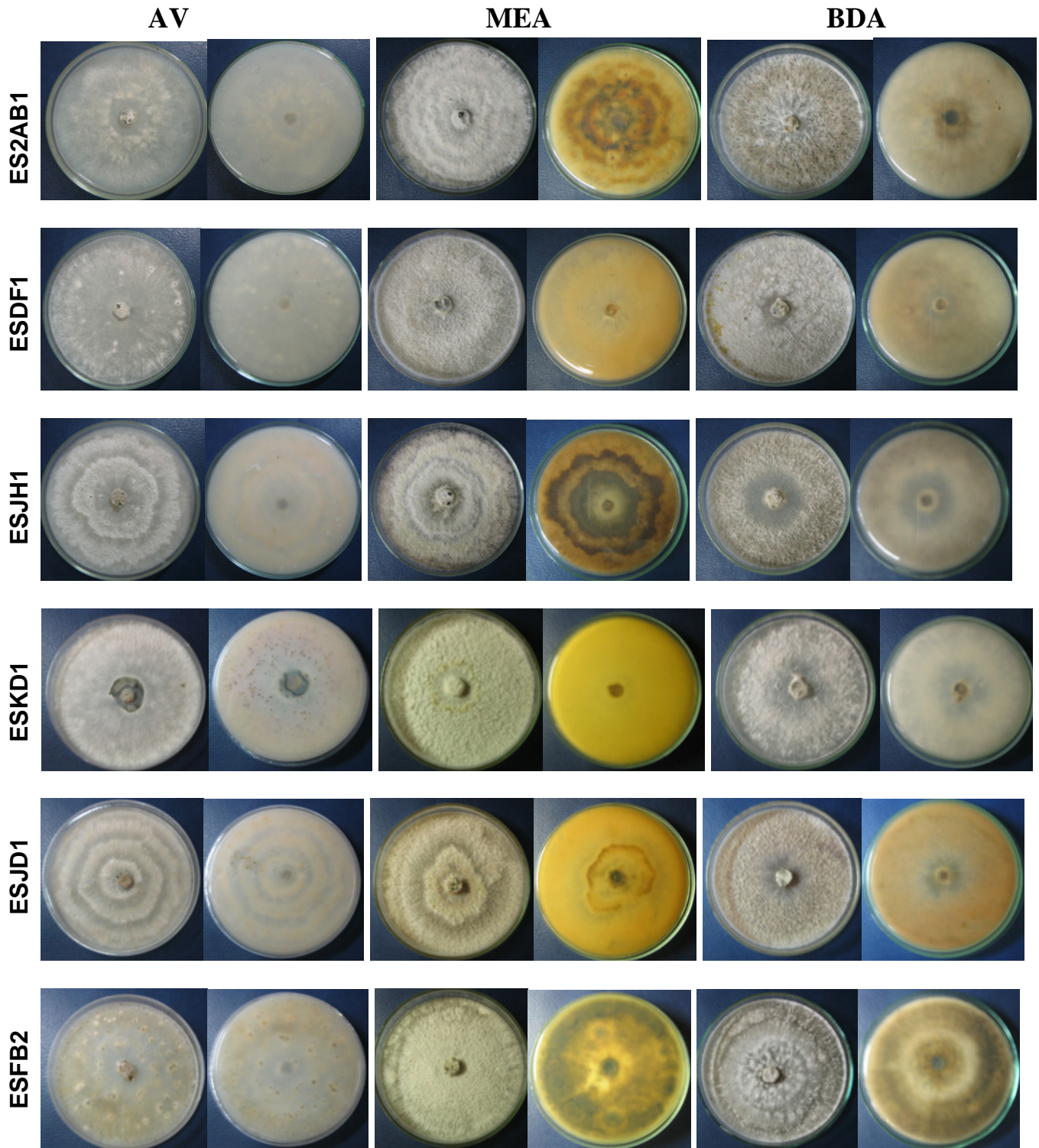


FIGURA 3. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE *Maytenus ilicifolia* EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUAÇÃO)

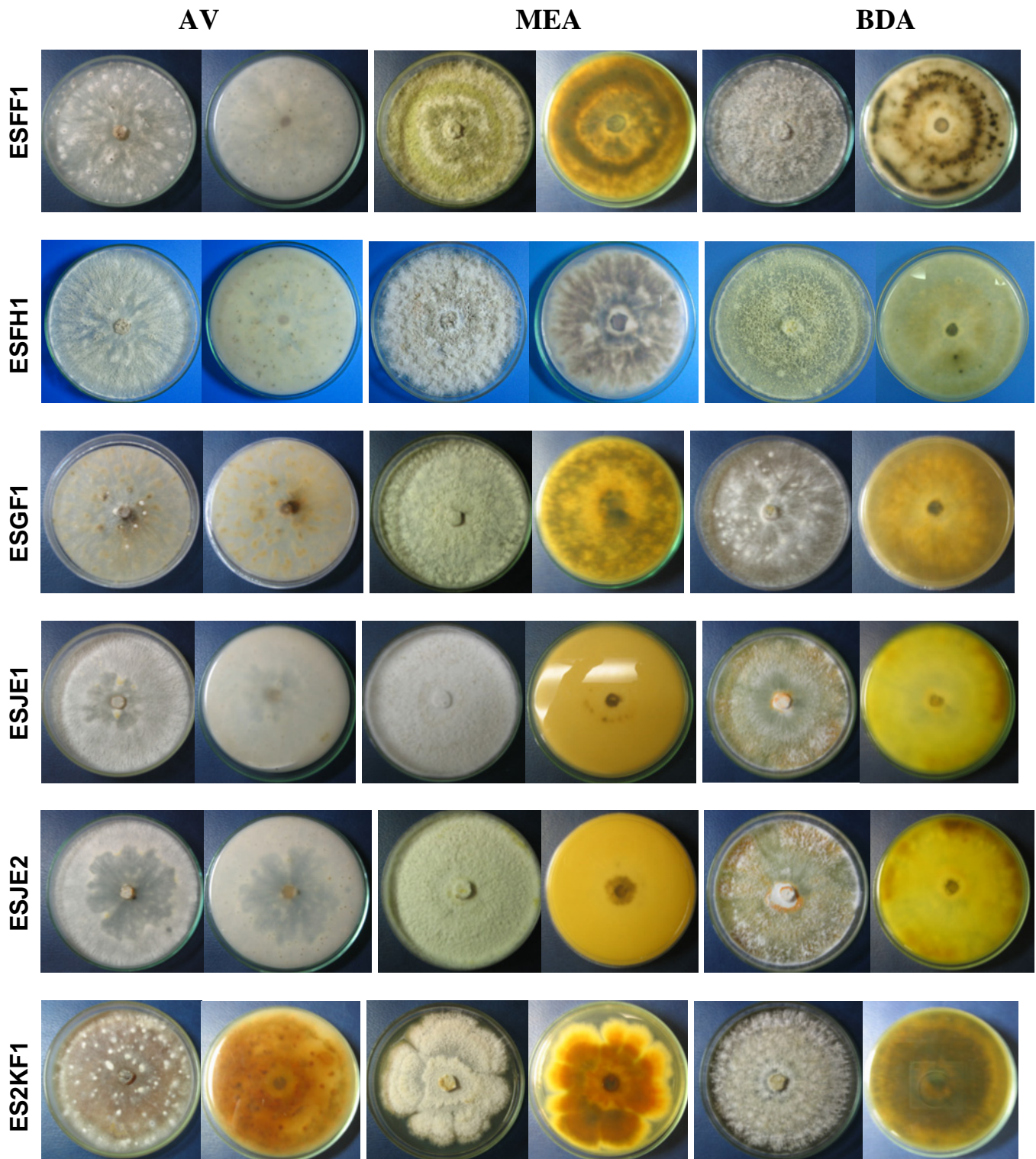


FIGURA 3. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* ISOLADOS DE *Maytenus ilicifolia* EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUAÇÃO)

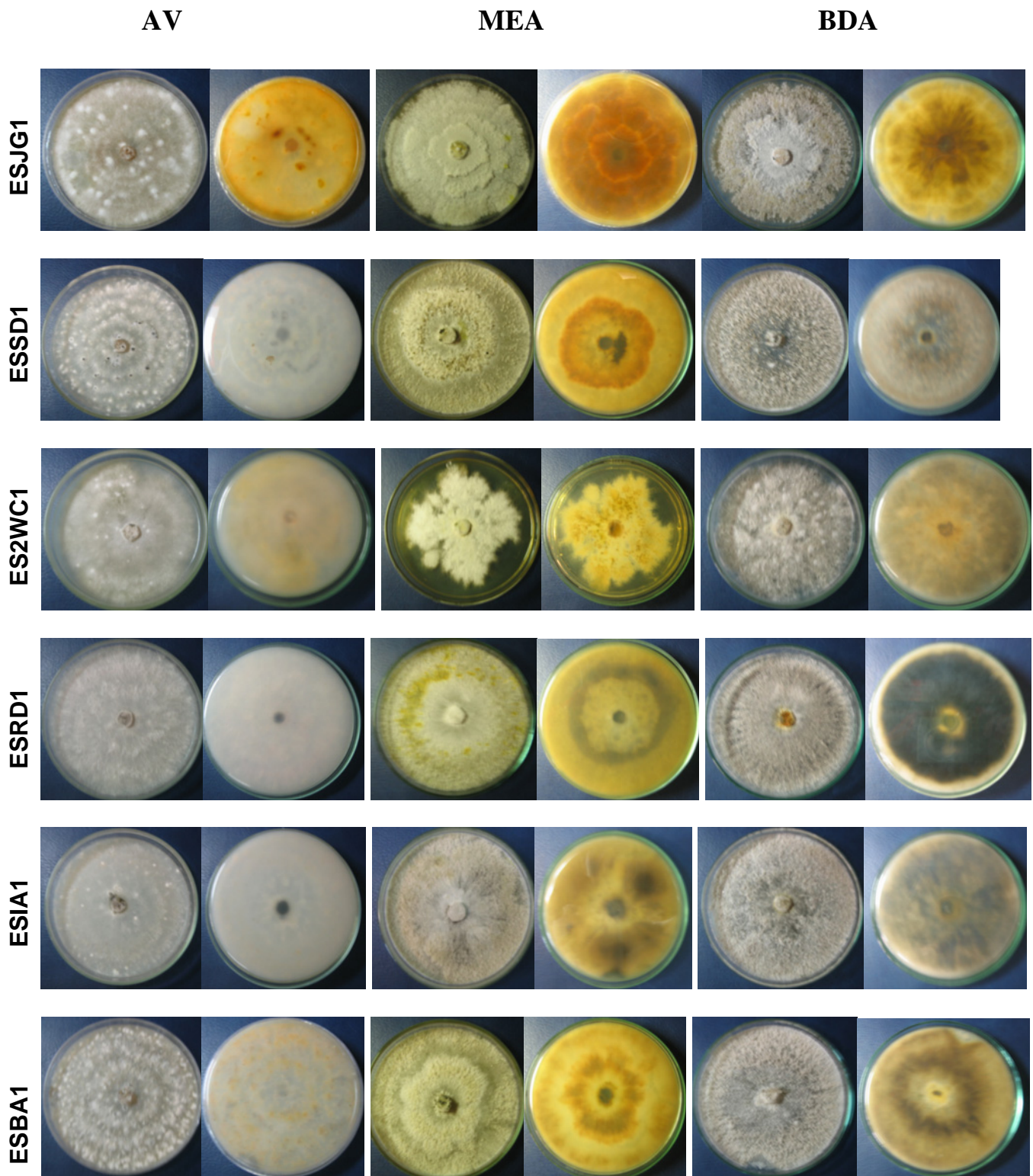


FIGURA 3. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDÓFITOS DE *Phomopsis* E *Diaporthe* (BA1) ISOLADOS DE *Maytenus ilicifolia* EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA (CONTINUAÇÃO)

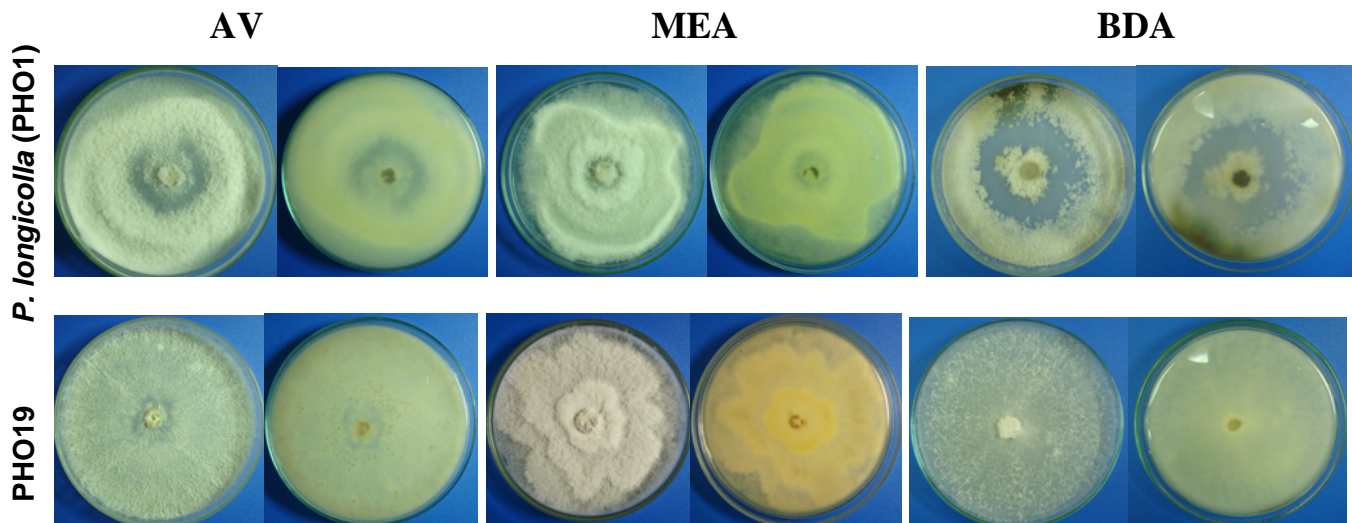


FIGURA 4. MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS PATOGENICOS OBTIDOS DE *Glycine max* EM TRÊS MEIOS DE CULTURA APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA

Na avaliação do diâmetro das colônias houve diferença significativa entre os isolados de *Phomopsis* dentro dos diversos meios de cultura avaliados. Entre os meios de cultura MEA, BDA e AV houve diferença significativa de crescimento, em geral o crescimento micelial foi menor no meio AV (ANEXO 1). Portanto os grupos de *Phomopsis* formados quando considerada à taxa de crescimento foram inferidos para os meios de cultura separadamente.

Na figura 5 observa-se o resultado do diâmetro médio das culturas dos isolados após 5 dias de crescimento em meio MEA. Os isolados foram reunidos em oito grupos diferentes: **A:** A323, SM9631, ESKD1, A134 e ESIE1; **B:** A116, A334, A215A, ESSD1; **C:** A321, MU0123, ESGF1, ESRD1, AT9811, SM9713, A123, ESJH1, ESDF1, A131, ESIA1, ESBA1, ESJD1; **D:** A333A, A135, ES2NA1, A124, A132, SM9714, ESFB2; **E:** A115B, ES2AB1, A216B, A113; **F:** PHO1, SM9638, ES2WF1, A126, ESJE1, ESPAC22, ESFF1, ES2KF1, ESJG1, ES80J; **G:** ESJE2, ESFH1, AT9906, ESGA1, AT9810, ES2WC1. Os isolados do grupo **A** apresentaram os maiores valores de crescimento radial, em torno de 7,0 cm (após 5 dias de crescimento) e o grupo **H** apresentou menor crescimento micelial, em torno de 2,0 cm (após 5 dias de crescimento) (ANEXO 4).

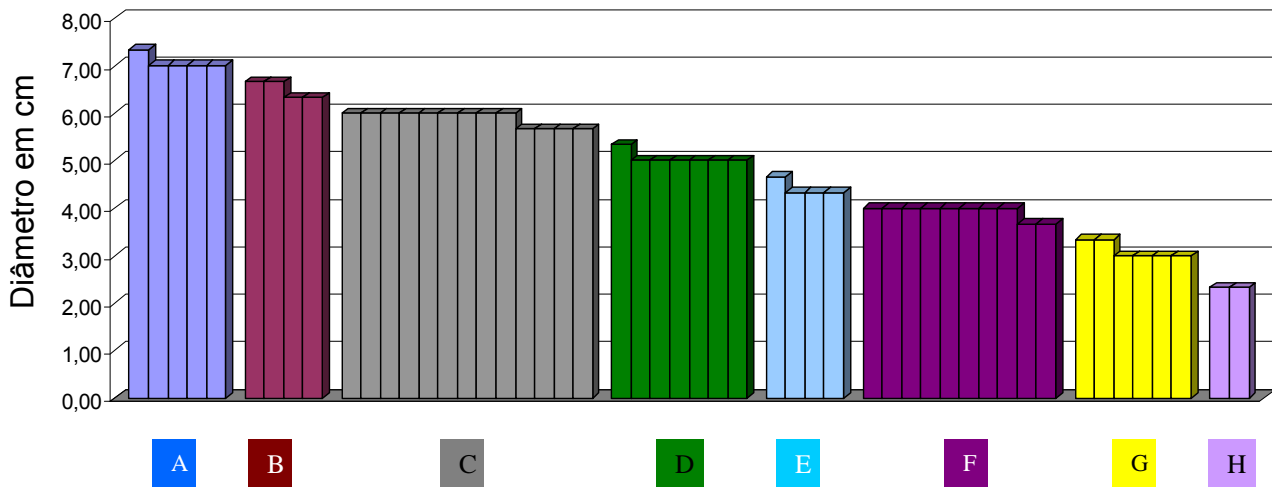


FIGURA 5. DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* spp EM MEIO MEA , APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO, A 22 °C, SOB LUZ CONTÍNUA

**FONTE:** O autor

**NOTA:** As letras indicam os diferentes agrupamentos formados em relação ao diâmetro médio das colônias dos isolados endofíticos de *Phomopsis* spp.. Os isolados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade (ANEXO 4). **A:** A323, SM9631, ESKD1, A134 e ESIE1; **B:** A116, A334, A215A, ESSD1; **C:** A321, MU0123, ESGF1, ESRD1, AT9811, SM9713, A123, ESJH1, ESDF1, A131, ESIA1, ESBA1, ESJD1; **D:** A333A, A135, ES2NA1, A124, A132, SM9714, ESFB2; **E:** A115B, ES2AB1, A216B, A113; **F:** PHO1, SM9638, ES2WF1, A126, ESJE1, ESPAC22, ESFF1, ES2KF1, ESJG1, ES80J; **G:** ESJE2, ESFH1, AT9906, ESGA1, AT9810, ES2WC1.

O diâmetro médio das culturas dos isolados após 5 dias de crescimento em meio BDA está representado na figura 6. Os isolados foram reunidos em seis grupos diferentes: **A:** ESBA1, A323, A215A, ESSD1, SM9713, ESGF1, SM9631, ESJD1, ESKD1, A334; **B:** ESDF1, A132, A123, A333A, MU0123, ESJH1, A321, ESRD1, A116, A134, A115B; **C:** ESIA1, A131, SM9714, A135, ESIE1, ESFB2, A124, ESPAC22, ES2KF1, A113, ESJE1; **D:** ESJE2, ESFH1, ESJG1, ES2WC1, PHO1, SM9638, ES2NA1, ES2AB1, ESFF1, AT9811, AT9810, ES2WF1, A126, PHO19, A216B, ES80J, ESGA1; **E:** AT9906; **F:** A333B.

Em geral a taxa de crescimento foi maior em meio BDA. Os isolados do grupo **A** apresentaram as maiores taxas de crescimento, em torno de 7,0 cm (após 5 dias de

crescimento) e o grupo **F**, representado pelo isolado A333B, apresentou menor crescimento micelial (ANEXO 2).

Estudos sobre fisiologia envolvendo o gênero *Phomopsis* são escassos. Almeida (1982) estudando *Phomopsis sojae*, isolados de sementes de soja, em seis diferentes meios de cultura e nos regimes de luminosidade claro contínuo e escuro contínuo, verificou maior crescimento do fungo nos meios de haste de soja, extrato de malte, aveia, cenoura e BDA, não houve efeito da luz sobre o crescimento micelial de nenhum dos isolados.

Gurgel, Menezes e Coelho (1997), verificaram maior crescimento micelial de *P. anacardii* e *P. mangiferae* no meio BDA e uma melhor esporulação nos meios BDA e V8 (Campbell CO.), após 15 e 30 dias de incubação. No presente trabalho foi verificado maior crescimento dos isolados de *Phomopsis* em meio BDA seguido do meio MEA, em meio AV a taxa de crescimento foi inferior.

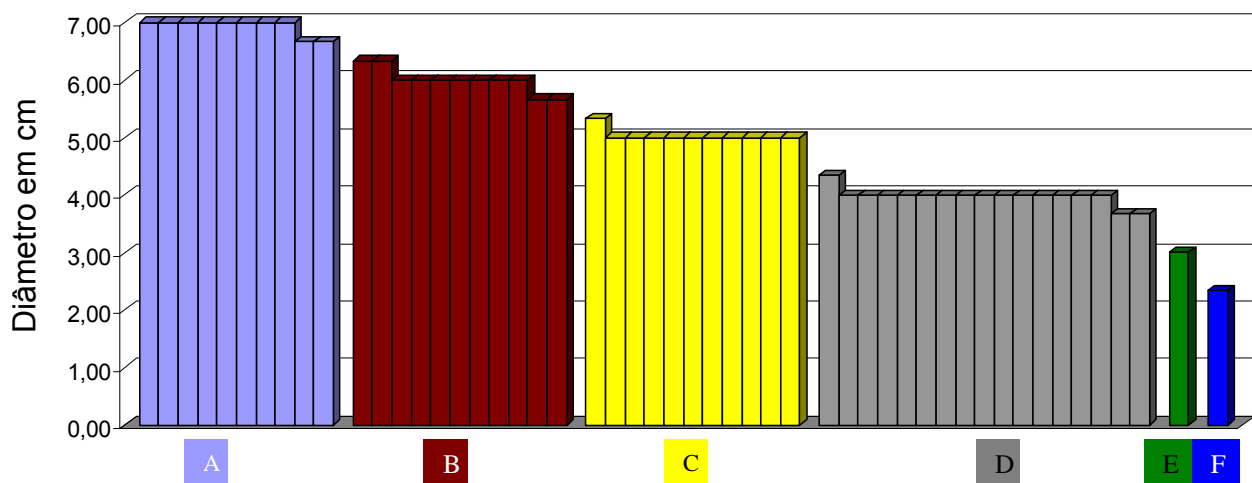


FIGURA 6. DIÂMETRO MÉDIO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* spp EM MEIO BDA, APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO, A 22 °C, SOB LUZ CONTÍNUA

**FONTE:** O autor

**NOTA:** As letras indicam os diferentes agrupamentos formados em relação ao diâmetro médio das colônias dos isolados endofíticos de *Phomopsis*. Os isolados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade (ANEXO 2). **A:** ESBA1, A323, A215A, ESSD1, SM9713, ESGF1, SM9631, ESJD1, ESKD1, A334; **B:** ESDF1, A132, A123, A333A, MU0123, ESJH1, A321, ESRD1, A116, A134, A115B; **C:** ESIA1, A131, SM9714, A135, ESIE1, ESFB2, A124, ESPAC22, ES2KF1, A113, ESJE1; **D:** ESJE2, ESFH1, ESJG1, ES2WC1, PHO1, SM9638, ES2NA1, ES2AB1, ESFF1, AT9811, AT9810, ES2WF1, A126, PHO19, A216B, ES80J, ESGA1; **E:** AT9906; **F:** A333B.

O diâmetro médio das culturas dos isolados após 5 dias de crescimento em meio AV está representado na figura 7. Os isolados foram reunidos em sete grupos diferentes: **A**: ESKD1; **B**: ESJE2, A123; **C**: ESJE1, SM9638, AT9811, SM9713, PHO1, ESBA1, SM9631, ESFB2, A334, A323, MU0123; **D**: A333A, ESJD1, ESGF1, A116; **E**: ESPAC22, ESDF1, A321, A132, ES2KF1, ESJG1, ESRD1, PHO19, A115B, A124, ESFF1, A134, ESIE1, A135, A131, A113, ES2WF1, ESSD1, ESIA1; **F**: ESGA1, ESJH1, ESFH1, AT9906, ES2NA1, A216B, ES80J, A215A; **G**: AT9810, A333B, ES2AB1, SM9714, ES2WC1, A126. Apenas o isolado ESKD1 representante do grupo **A** apresentou taxa de crescimento rápida de 7,0 cm (após 5 dias de crescimento), a maioria dos isolados tiveram crescimento lento (ANEXO 3).

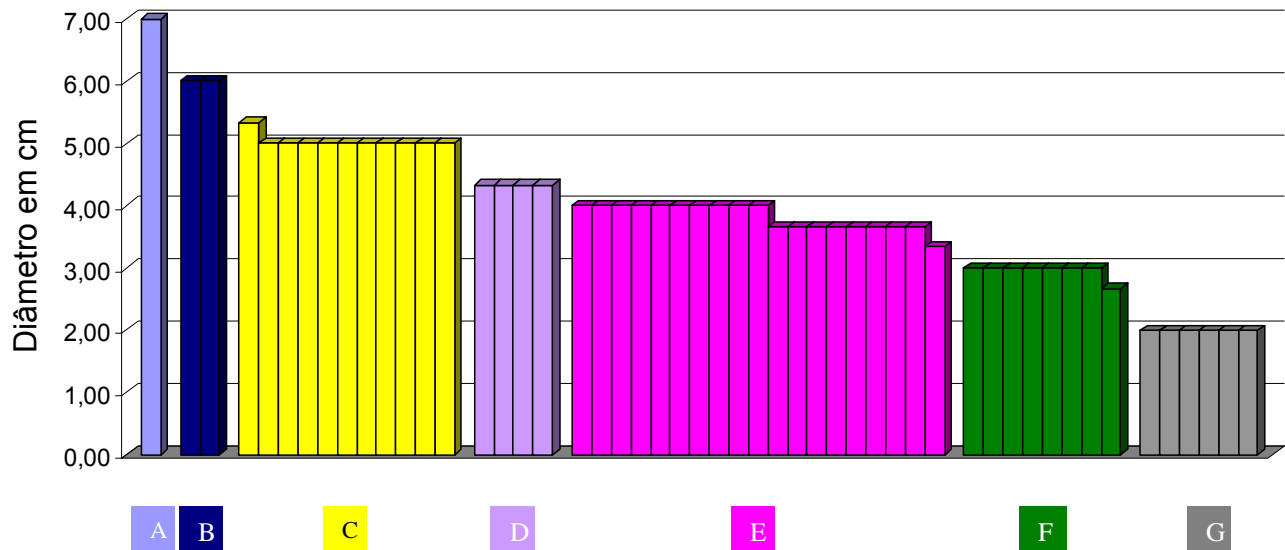


FIGURA 7. AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DO DIÂMETRO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* spp. EM MEIO AV, APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO, A 22 °C, SOB LUZ CONTÍNUA

**FONTE:** O autor

**NOTA:** As letras indicam os diferentes agrupamentos formados em relação ao diâmetro médio das colônias dos isolados endofíticos de *Phomopsis* spp. Os isolados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade (ANEXO 3). **A**: ESKD1; **B**: ESJE2, A123; **C**: ESJE1, SM9638, AT9811, SM9713, PHO1, ESBA1, SM9631, ESFB2, A334, A323, 01.23; **D**: A333A, ESJD1, ESGF1, A116; **E**: ESPAC22, ESDF1, A321, A132, ES2KF1, ESJG1, ESRD1, PHO19, A115B, A124, ESFF1, A134, ESIE1, A135, A131, A113, ES2WF1, ESSD1, ESIA1; **F**: ESGA1, ESJH1, ESFH1, AT9906, ES2NA1, A216B, ES80J, A215A; **G**: AT9810, A333B, ES2AB1, SM9714, ES2WC1, A126.



Foi observado que, dos 49 endófitos e os 2 isolados patogênicos de *Phomopsis* spp., avaliados (TABELA 1), 27 apresentaram variação intra-individual quanto ao crescimento nos diversos meios. Por exemplo, os isolados A323 e SM96.31 em meio MEA e BDA pertencem ao grupo **A** e no meio AV ao grupo **C**. Os outros 24 isolados não apresentaram variação entre os agrupamentos formados nos diferentes meios.

Os isolados que se agrupam baseados no crescimento nos três meios, não são os mesmos quando se considera a cor do verso e reverso da placa, assim como, não são semelhantes aos agrupamentos formados quando comparados com os bordos e aspecto da colônia.

Gurgel, Menezes e Coelho (2002) estudando *Phomopsis anacardii* e *Phomopsis mangiferae* observaram maior produção de picnídios nos meios de extrato de malte, aveia, haste de soja e cenoura, somente quando mantidos sob luz contínua. A produção de picnídios foi reduzida em alternância de luz e quase nula no escuro contínuo. No presente trabalho foi observado que a maioria dos isolados formaram estruturas de reprodução com o uso de luz contínua em baixas temperaturas 22 a 25 °C e pH 5,8 nos três meios avaliados, após 14 dias de crescimento.

Segundo Cochrane (1959) e Griffin (1994), a luminosidade promove formação das estruturas reprodutivas, assim como estão diretamente ligadas à composição do meio de cultura através de diferentes reações enzimáticas. Leonian (1924) descreve que o efeito da luz como indutor da reprodução de fungos, está associado às modificações que ocorrem no seu metabolismo celular, combinados aos elementos que constituem o meio de cultura.

Timnick, Lilly e Barnett (1951) detectaram efeito positivo da luz para a formação de picnídios ao verificarem que o regime escuro contínuo inibia a formação de picnídios de *Diaporthe phaseolorum*. Resultados semelhantes foram observados por Corrêa (1995) avaliando *Phomopsis* sp. provenientes de sementes florestais, observou uma melhor esporulação em meio aveia sob regime de claro contínuo, por 12 dias de incubação.

Na análise da micromorfologia observou-se que os isolados apresentavam estruturas de reprodução a partir de 14 dias até 21 dias de crescimento (FIGURA 8),

exceto os isolados SM9811, SM9638 e *Phomopsis longicolla* PHO1 que não formaram estruturas de reprodução em nenhum dos meios ensaiados. Os isolados SM98.11 e SM9638 foram descritos como pertencentes ao gênero *Phomopsis* e depositados na Coleção de Cultura de Fungos do Departamento de Micologia (IOC) da FIOCRUZ e foram descritos por Rodrigues e Samules (1999). O isolado PHO1 foi isolado e identificado pela EMBRAPA (Londrina-PR), como pertencente à espécie *P. longicolla*.

Os conídios do tipo alfa foram menos freqüentes do que os do tipo beta. Em meio de cultura BDA apenas 11 isolados apresentaram o tipo de esporo alfa, já os beta conídios, filiformes, curvos na extremidade ou ligeiramente curvos, foram visualizados em quase todos os isolados de *Phomopsis* spp.

Foi observado que, para os isolados que apresentaram os dois tipos de esporos foram visualizados com 14 dias de crescimento apenas alfa conídios hialinos com vacúolos nas extremidades de forma ovóide, e não foram visualizados beta conídios. Após 21 dias os dois tipos de esporos foram visualizados nesses isolados (FIGURA 8a e 8c). Alguns alfa conídios apresentavam mais de dois vacúolos nas extremidades (FIGURA 8b). Essa variação intra-individual também foi observada em relação à morfologia do beta conídio, em que alguns apresentam curvatura na extremidade, outros ligeiramente curvos (FIGURA 8c).

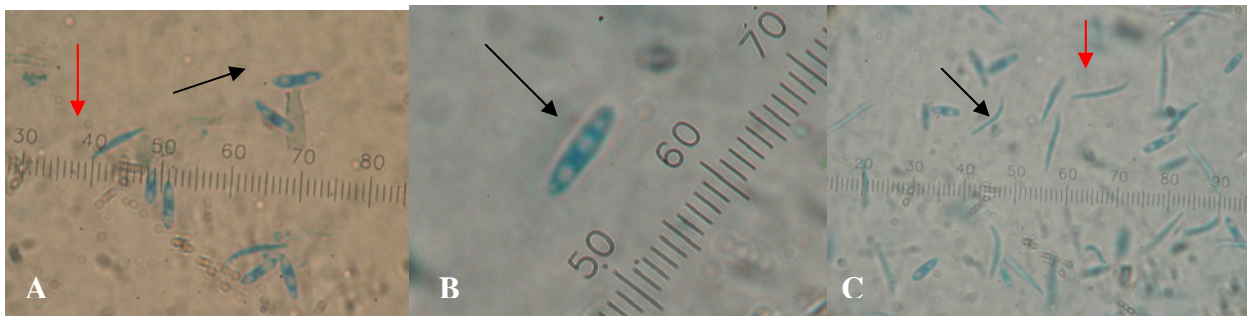


FIGURA 8. FOTOMICROGRAFIA DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* EM BDA APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA

**FONTE:** O autor

**NOTA:** **A** - isolado SM96.31, aumento de 400x; **B**- isolado SM9714 aumento de 1000x. **C**- isolado SM9713 aumento de 400x, microscopia óptica. Setas pretas indicam os alfa conídios e setas vermelhas os beta conídios. Escala em 1μM.

Alfa conídios do isolado SM9713 provenientes dos meios de cultura AV (FIGURA 9a) e BDA (FIGURA 9e) apresentaram grande variação morfológica. Na figura 9, no mesmo conidióforo é visível a diferença morfológica do alfa conídio. Na figura 9e o conidióforo apresenta alfa conídios com mais de duas gotas nas extremidades (SETA 1) e alfa conídios com apenas dois vacúolos (SETA 2). Em maior aumento é possível perceber que existem variações de dois, três e até quatro vacúolos no mesmo isolado (FIGURA 9a, 9b e 9c). Tal variação pode ser decorrente de diferenciados graus de maturação destes conídios, o que dificulta a caracterização morfológica de espécies do gênero *Phomopsis*.

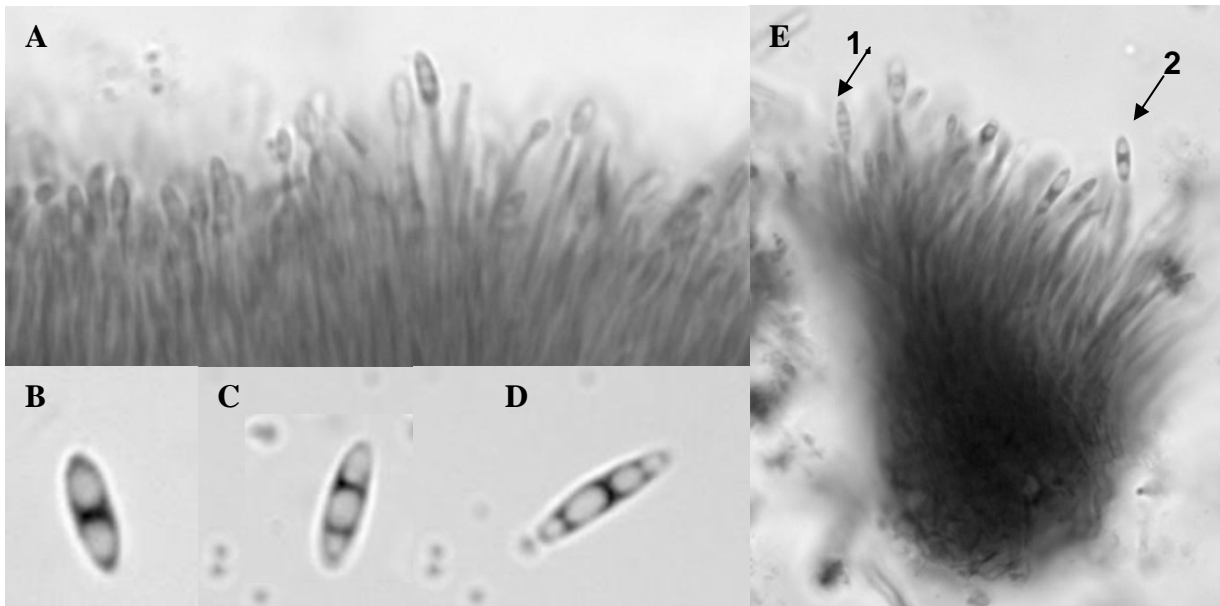


FIGURA 9. FOTOMICROGRAFIA DOS CONÍDIOS DO ISOLADO SM97.13 EM MEIOS BDA e AV APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA

**FONTE:** O autor

**NOTA:** A - em meio AV, aumento de 400x; B, C e D- em meio BDA, aumento de 650x. E- em meio BDA , aumento de 400x. Microscopia ótica.

A medida do comprimento dos beta conídios em meio BDA mostrou que os isolados apresentam diferenças estatísticas significativas, reunindo os isolados em 15

grupos diferentes (ANEXO 5): **A** (AT9906, AT8010); **B** (ESFH1); **C** (ESPAC22, ES2KF1, SM9631); **D** (ESGA1, PHO19); **E** (ES80J); **F** (ESRD1); **G** (ESJE2, ESFB2, ESJE1); **H** (ESJG1); **I** (A323); **J** (A333A, A135, A124, A126, A132, A131, A134, A115B, ESIE1); **K** (ES2WC1, ES2WF1); **L** (SM9713, A334, ESIA1, A333B, ESFF1, ESGF1); **M** (ES2AB1, A123, A113, ESJD1); **N** (ESKD1, ES2NA1, A215A, SM9714); **O** (ESSD1, ESJH1, MU0123, A321, ESDF1, A216B, A116), (FIGURA 10). Os isolados também não se agrupam de acordo com os outros critérios avaliados, como, a cor do verso e reverso da placa, diâmetro das colônias, assim como, não são semelhantes aos agrupamentos formados quando comparados com os bordos e aspecto do micélio.

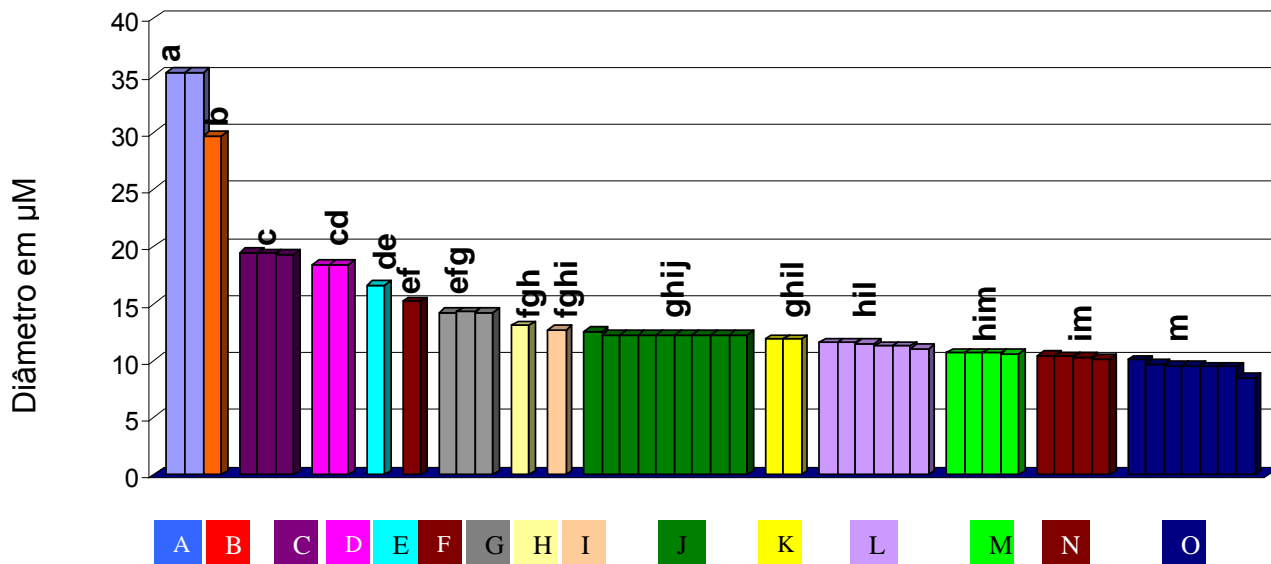


FIGURA 10. COMPRIMENTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* spp. APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO EM BDA A 22°C SOB LUZ CONTÍNUA

**FONTE:** O autor

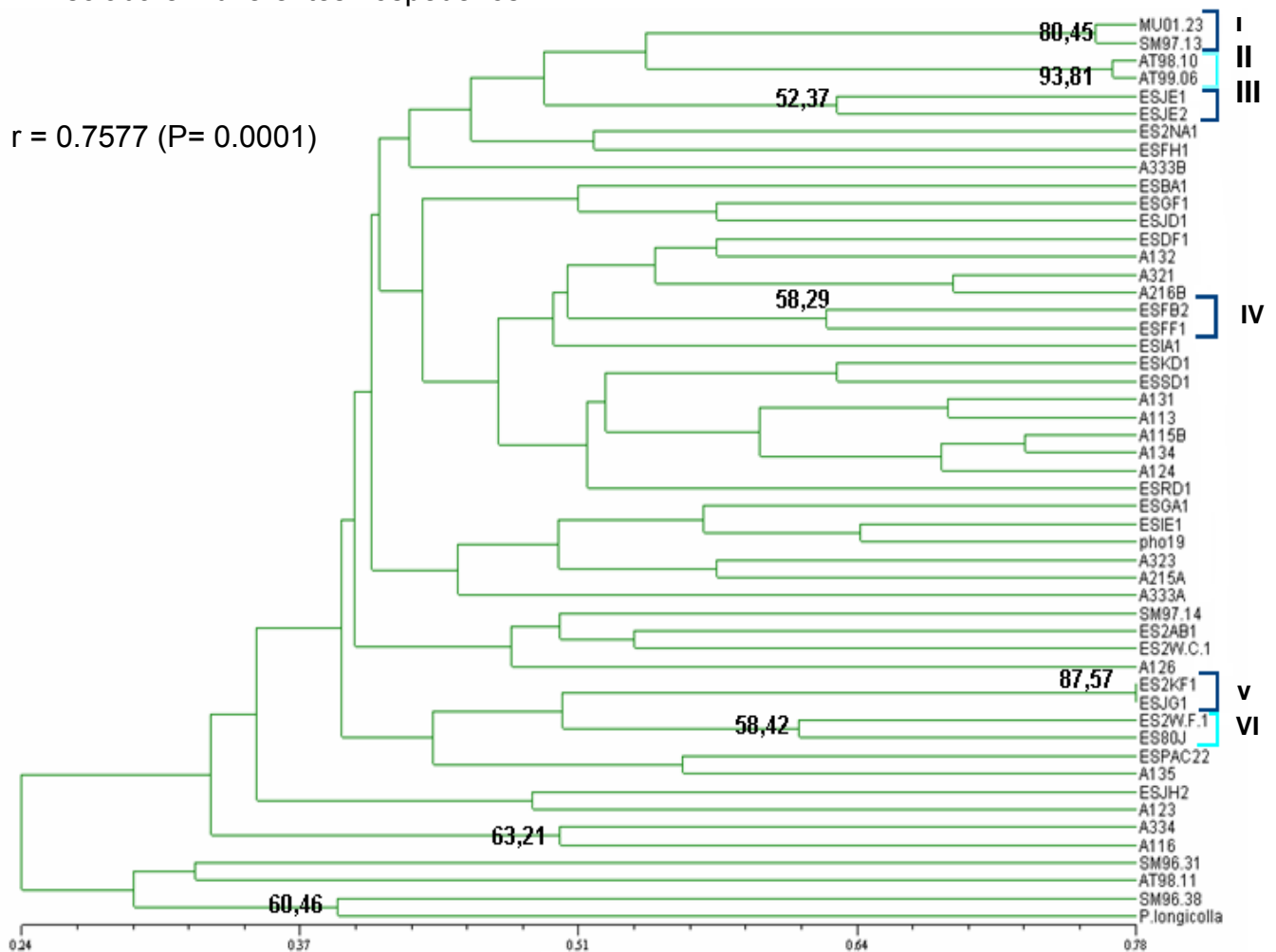
**NOTA:** As letras maiúsculas indicam os diferentes agrupamentos formados em relação à média do comprimento de beta conídio dos isolados endofíticos de *Phomopsis* spp.. Isolados de cada agrupamento: **A** (AT9906, AT8010); **B** (ESFH1); **C** (ESPAC22, ES2KF1, SM9631); **D** (ESGA1, PHO19); **E** (ES80J); **F** (ESRD1); **G** (ESJE2, ESFB2, ESJE1); **H** (ESJG1); **I** (A323); **J** (A333A, A135, A124, A126, A132, A131, A134, A115B, ESIE1); **K** (ES2WC1, ES2WF1); **L** (SM9713, A334, ESIA1, A333B, ESFF1, ESGF1); **M** (ES2AB1, A123, A113, ESJD1); **N** (ESKD1, ES2NA1, A215A, SM9714); **O** (ESSD1, ESJH1, MU0123, A321, ESDF1, A216B, A116). As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (ANEXO 5).

Desta forma, as características macroscópicas (coloração, bordos e tipos de micélio da colônia) e de micromorfologia dos conídios, avaliadas isoladamente, não permitiram propor identificação das espécies dos isolados endofíticos de *Phomopsis*. Sendo assim, optou-se por realizar uma análise polifásica agrupando as características morfológicas analisadas, tais como: crescimento micelial, coloração e bordos da colônia, tipo de micélio; comprimento dos conídios e tipos de conídios produzidos em diferentes meios. Essa metodologia foi descrita por Figueiredo *et al.* (2006) para caracterizar isolados de *Pestalotiopsis*. Para todas estas características foram atribuídas notas de 0 ou 1, onde 0 representou ausência da característica e 1, a presença (ANEXO 12). Os resultados compuseram uma matriz binária, analisada pelo software NTSYS (coeficiente Jaccard) com o agrupamento pelo método UPGMA permitindo a construção de um dendrograma de similaridade morfológica (FIGURA 11).

De acordo com o dendrograma de similaridade morfológica (FIGURA 11), sugere-se a formação de seis grupos com elevados valores de *bootstrap*, que conferem robustez aos agrupamentos. No grupo I, estão reunidos os isolados MU0123 e SM9713; no grupo II os isolados AT9810 e AT9906; no grupo III, os isolados ESJE1 e ESJE2; no grupo IV os isolados ESFB2 e ESFF1; no grupo V os isolados ES2KF1 e ESJG1 e no grupo VI os isolados ES2WF1 e ES80J. Os demais agrupamentos formados não foram considerados, pois apresentam baixos valores de *bootstrap* e ou baixos valores de similaridade morfológica.

Os dados mostram elevada variabilidade morfológica dos isolados de *Phomopsis* avaliados, o que dificulta a delimitação de espécies apenas com dados morfológicos. Segundo Parmeter (1958) e Rehner e Uecker (1994) o alto grau de plasticidade das características morfológicas impossibilita a delimitação de espécies no gênero *Phomopsis*. Gamboa-Gaitán, Laureano e Bayman (2005) estudando isolados de *Phomopsis* endofíticos de *Guarea guidonia* (Meliaceae) de duas regiões de Luquillo (Porto Rico) relataram elevados níveis de variabilidade morfológica entre os isolados avaliados. Eles observaram uma mistura de diferentes morfotipos em ambas as regiões estudadas.

Neste trabalho foi observado um elevado nível de variabilidade morfológica dos isolados de *Phomopsis* spp., obtidos de seis diferentes espécies de plantas e regiões geográficas. Não foi possível observar estruturação populacional dos isolados em função da espécie hospedeira. Na figura 12 os isolados de *M. ilicifolia* encontram-se na coloração rosa e distribuídos ao longo dos dois eixos que representam os dois principais componentes de variação. Igualmente os isolados em preto representam as linhagens provindas de *S. terebinthifolius* e também encontram-se dispersos. Tais resultados não surpreendem, pois é possível que a mesma espécie de *Phomopsis* seja isolada em diferentes hospedeiros.

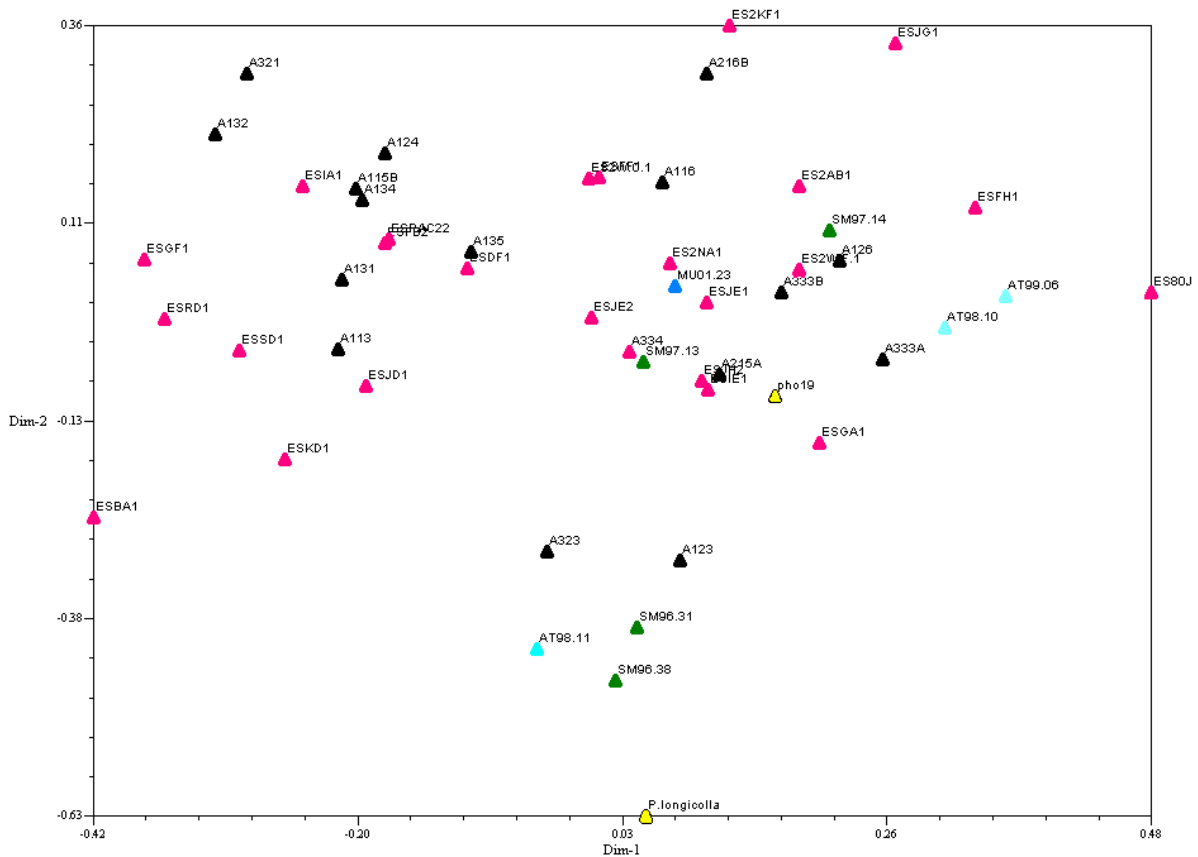


FONTE: O autor

COEFICIENTE DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA

FIGURA 11. DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* spp.

**NOTA:** I, II, III, IV, V, VI são grupos formados para inferir sobre a diversidade dos isolados endofíticos de *Phomopsis*; Os valores a esquerda dos nós indicam os valores de *bootstrap*.



FONTE: O autor

FIGURA 12. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* spp.

NOTA: Isolados em coloração rosa obtidos de *Maytenus ilicifolia*; Em preto: *Schinus terebinthifolius*; Em azul escuro: *Myracrodruon urundeuva*; Em azul claro: *Aspidosperma tomentosum*; Em verde: *Spondias mombin*.

### 5.3 Caracterização Molecular de *Phomopsis* spp.

#### 5.3.1 RAPD

Os isolados de *Phomopsis* spp. foram avaliados por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD a fim de verificar a magnitude da variabilidade genética. Foram analisados por esta metodologia 54 isolados. Destes, 47 *Phomopsis* spp. endófitos, os isolados MU0123 e SM9638 não amplificaram em nenhuma das condições ensaiadas; dois isolados de *Phomopsis* patógenos de soja e cinco isolados de *Pestalotiopsis*. Foram utilizados 4 oligonucleotídeos, gerando 99 bandas. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 400 a 2600 pb e podem ser visualizados nas Figuras 13 a 16.





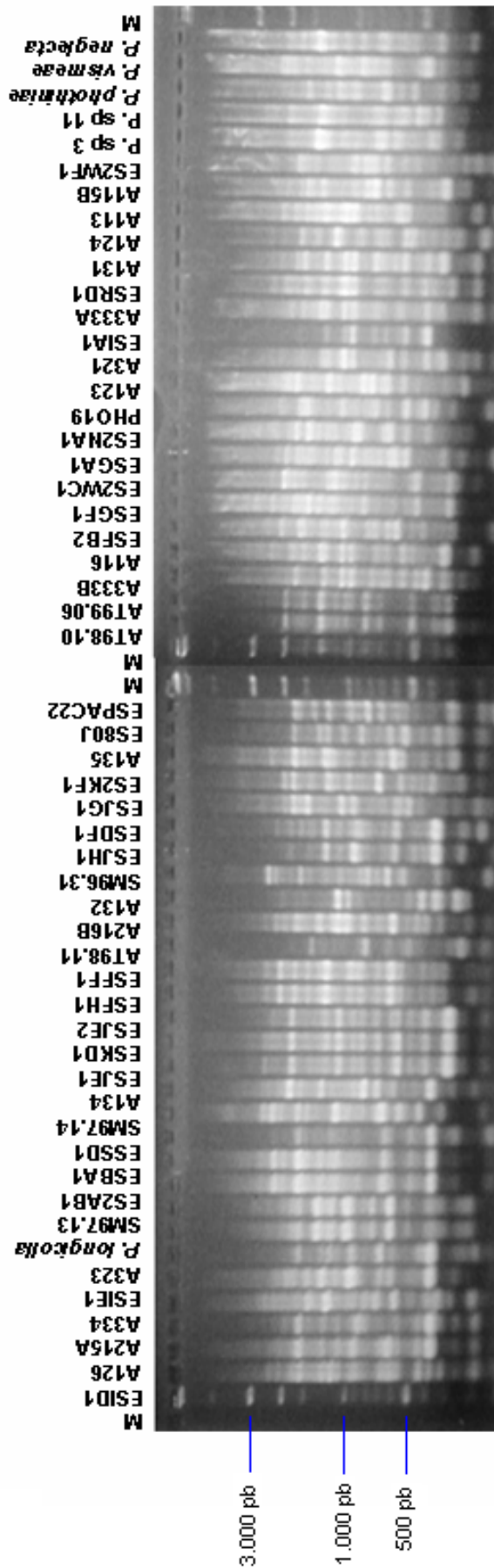


FIGURA 15. PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O OLIGONUCLEOTÍDEO OPX19 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* sp. E GRUPO EXTERNO *Pestalotiopsis*

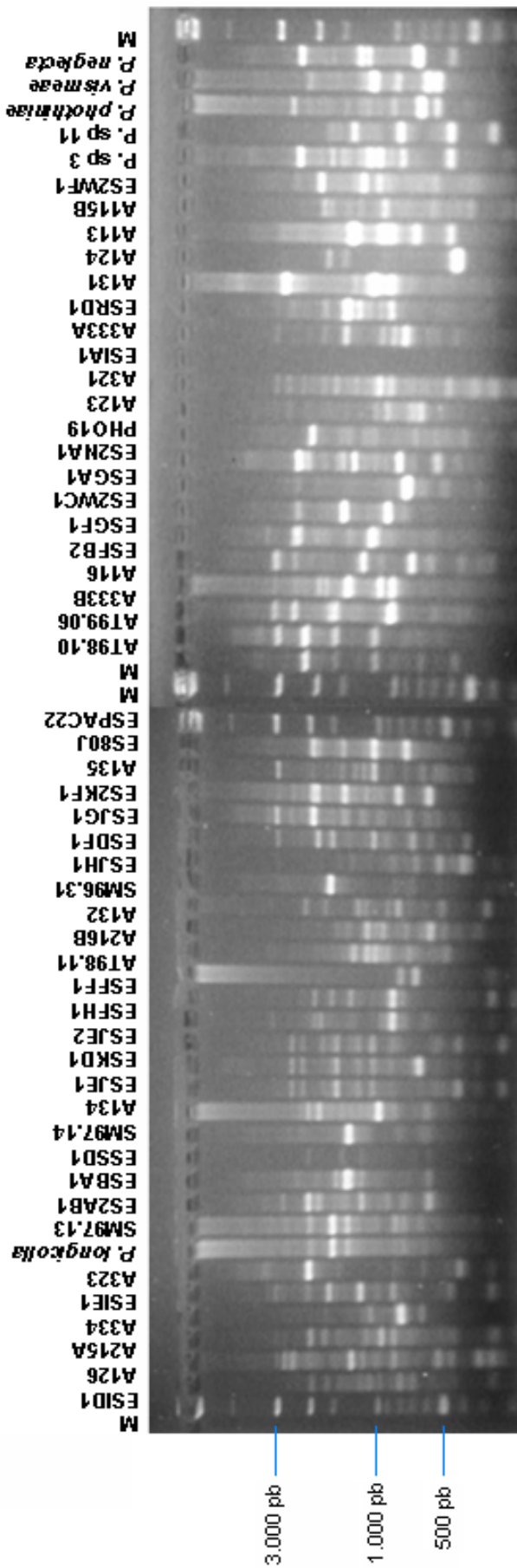


FIGURA 16. PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O OLIGONUCLEOTÍDEO OPE08 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* sp. E GRUPO EXTERNO *Pestalotiopsis*

A análise destes marcadores RAPD permitiu a construção de um dendrograma de similaridade genética (FIGURA 17). O coeficiente de correlação das matrizes de similaridade genética e cofenética, obtido pelo teste de Mantel, foi elevado ( $r=0,8157$  e  $p=0,0001$ ), indicando que o dendrograma representa de forma adequada a matriz de similaridade genética obtida pelos marcadores de RAPD. Entretanto, os valores de *bootstrap* da maioria dos agrupamentos formados foram baixos. Desta forma, somente foram considerados na análise os agrupamentos com bom suporte de *bootstrap* e coeficientes de similaridade superiores a 50%.

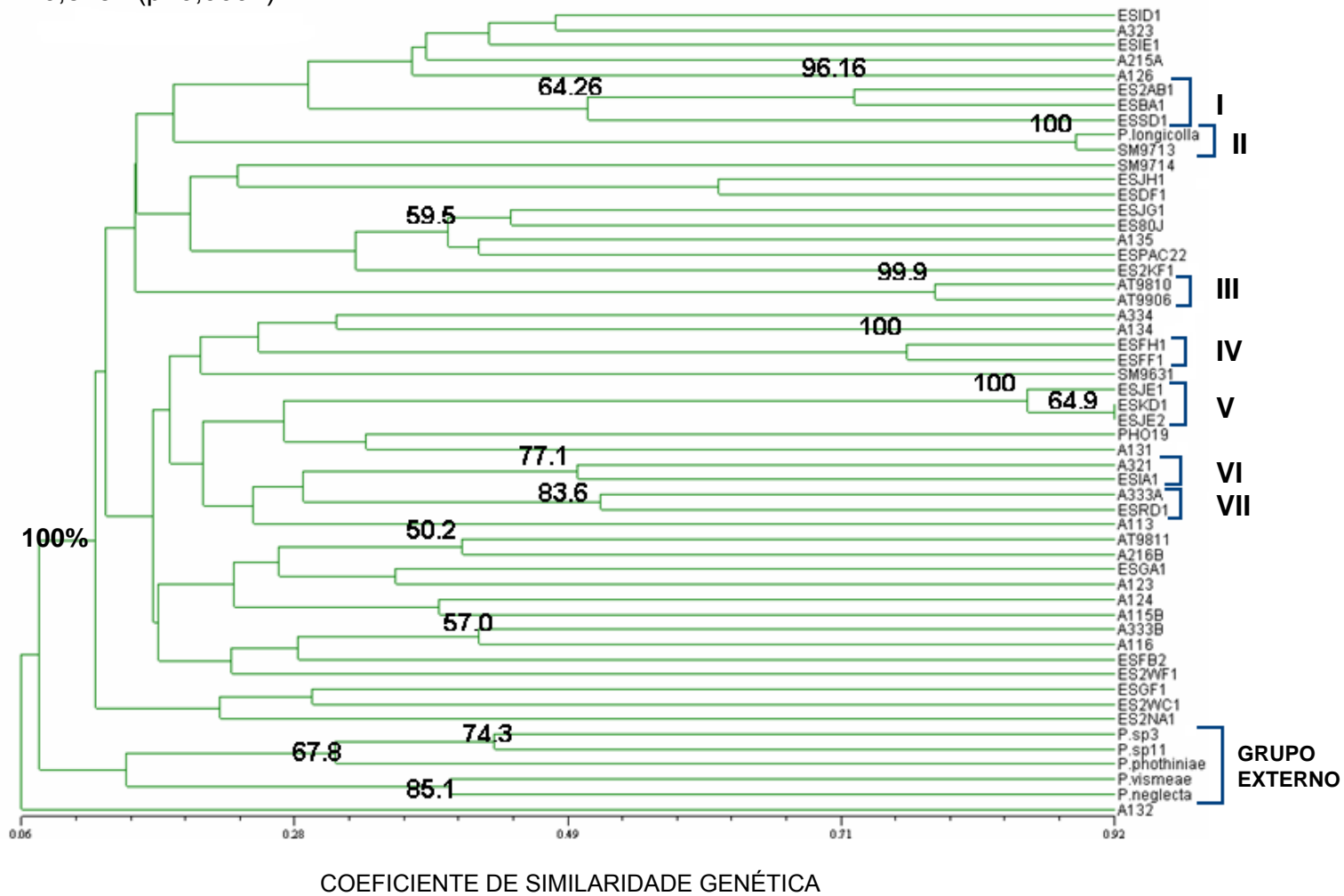
Os dados indicam elevada variabilidade genética dos isolados de *Phomopsis* spp. avaliados (FIGURAS 17 e 18), com a formação de sete grupos. Os isolados de *Pestalotiopsis*, utilizados como grupo externo, formaram um grupo (*bootstrap* = 100%) isolado (FIGURA 17) sendo relevante para inferir a magnitude da variabilidade genética observada entre os isolados de *Phomopsis* spp..

O primeiro agrupamento reúne três endófitos de Espinheira Santa, ESBA1, ES2AB1 e ESSD1 (49% de similaridade e *bootstrap* = 64%). Esses isolados foram obtidos do mesmo isolamento e pomar (CNPQ/EMPRAPA, Colombo/PR), porém de tecidos e plantas diferentes. Os isolados ESBA1 e ESSD1 foram obtidos de pecíolo enquanto ES2AB1 foi isolado de folha. É importante observar que o isolado ESBA1 apresentou estrutura de reprodução sexual, sendo classificado como *Diaporthe* sp., e, no entanto apresenta alto valor de similaridade genética com os isolados de *Phomopsis* sp., sugerindo assim, que pertençam ao mesmo complexo *Phomopsis/ Diaporthe*. Esses isolados não se agrupam quanto aos caracteres morfológicos (FIGURAS 11 e 12).

O segundo agrupamento, com 89,3% de similaridade genética e com *bootstrap* de 100%, compreende *P. longicolla* (PHO1), uma linhagem patogênica de soja isolada em Primavera do Leste – MT, e o isolado SM9713, endófito de *Spondias mombin* coletado em Redenção – PA. Além de coletados em lugares e hospedeiros totalmente diferentes esses isolados apresentam características morfológicas divergentes, pois não pertencem ao mesmo agrupamento em nenhuma das características morfológicas analisadas. Entretanto, a alta similaridade genética destes isolados sugere que

pertençam à mesma espécie, o que reforça as observações anteriores de que a definição de espécie do gênero *Phomopsis* não é possível utilizando-se apenas características morfológicas.

$r = 0,8157$  ( $p = 0,0001$ )



FONTE: O autor

FIGURA 17. DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE *Phomopsis* spp. POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

O terceiro agrupamento, com 75% de similaridade genética (FIGURA 17), compreende dois isolados endofíticos de *Aspidosperma tomentosun* AT9810 e AT9906. Esses isolados apresentaram características morfológicas muito semelhantes, formando o agrupamento II com 81 % de similaridade morfológica (FIGURA 11).

O quarto agrupamento, com 72% de similaridade genética, compreende os isolados ESFH1 e ESFF1, provenientes do pecíolo de Espinheira Santa da mesma coleta, porém novamente, eles não se agrupam quanto aos caracteres morfológicos observados (FIGURAS 11 e 12).

O quinto agrupamento, com 85% de similaridade genética, reúne os isolados ESKD1 e ESJH2 e ESJH1, provenientes de pecíolo da Espinheira Santa, coletados na mesma data. Os isolados ESJH1 e ESJH2 foram obtidos do mesmo pecíolo e apresentam características morfológicas mais semelhantes entre si do que quando comparados ao isolado ESKD1 (FIGURA 11). Entretanto, a figura 17 revela que por meio de marcadores RAPD, os isolados ESKD1 e ESJH2 são mais próximos (92% de similaridade genética). Sugere-se assim, que os 3 isolados pertençam à mesma espécie.

O sexto agrupamento, com 52% de similaridade (FIGURA 17), compreende os isolados A321 obtido de Aroeira e ESIA1 obtido de Espinheira Santa. Além de coletados em lugares e hospedeiros totalmente diferentes esses isolados apresentam características morfológicas diferentes (FIGURAS 11 e 12). Apesar do valor de *bootstrap* atribuir confiabilidade a este agrupamento (77%) o valor de similaridade observado (52%) não é alto. Assim, não é possível inferir que pertençam à mesma espécie.

O mesmo ocorre com o sétimo agrupamento que, com 55% de similaridade, compreende os isolados A333A obtido de Aroeira e ESRD1 obtido de Espinheira Santa. Além de coletados em lugares e hospedeiros totalmente diferentes esses isolados apresentam características morfológicas diferentes, não pertencendo ao mesmo agrupamento quanto aos caracteres morfológicos (FIGURAS 11 e 12).

Esses resultados mostram que características morfológicas não são suficientes para inferir espécies neste gênero, analisadas individualmente ou em análise polifásica.



### 5.3.2 Seqüenciamento da região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA

Visando elucidar a taxonomia dos isolados de *Phomopsis* spp. utilizados neste trabalho foi realizado com sucesso o seqüenciamento da região ITS1 - 5,8S - ITS2 do rDNA de 29 isolados. Após o alinhamento e edição destas seqüências, foi realizada uma busca no banco de dados de seqüências (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a fim de identificar seqüências similares. Os isolados estão representados na árvore filogenética (FIGURA 19).

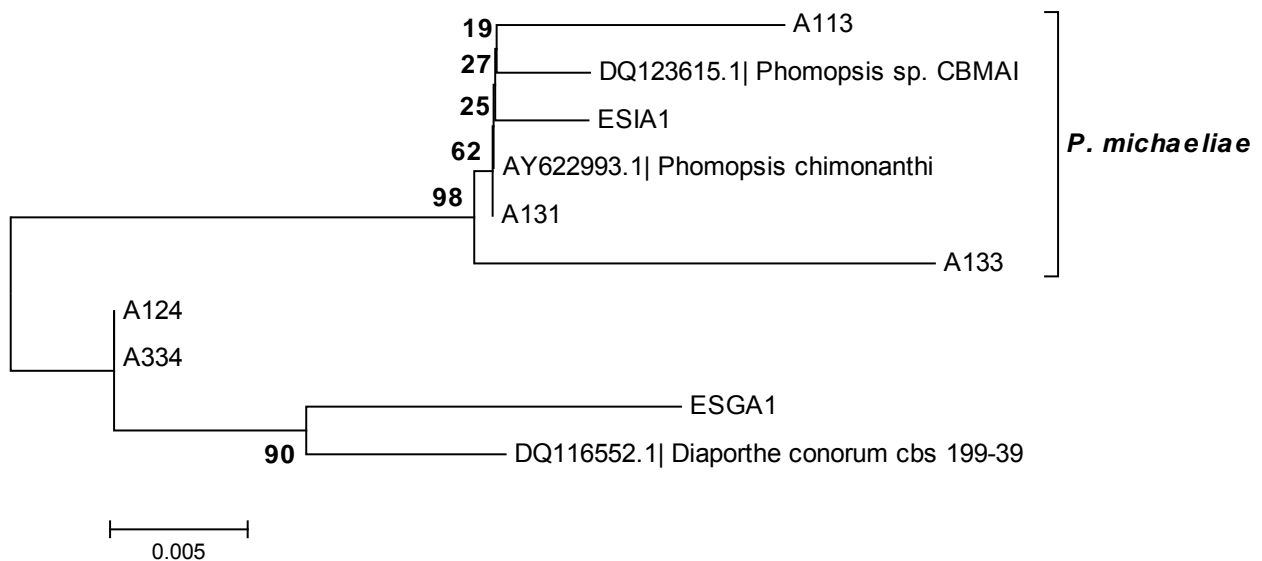
Os isolados agruparam-se em 16 clados, sugerindo que as plantas medicinais estudadas são colonizadas por pelo menos dezesseis diferentes espécies de *Phomopsis* (FIGURA 19). Entretanto, a maioria dos isolados não apresentaram seqüências ITS com identidade superior a 90% com nenhuma seqüência depositada no GenBank, e portanto, foram identificados como *Phomopsis* sp. S1 a *Phomopsis* sp. S12.

O primeiro clado (suportado com *bootstrap* de 98%) está representado na figura 20 e reúne os isolados A113, A131, A133, ESIA1 e A321 que apresentaram identidade com *P. chimonanthi* e com uma linhagem de *Phomopsis* sp. endofítica de *Coffea robusta* (DQ123615). Esta linhagem foi isolada e seqüenciada por Sette *et al.* (2006) e apresentou 99% de similaridade com as mesmas espécies *P. chimonanthi*, *P. michaeliae* e *Diaporthe helianthi* (FIGURAS 19 e 20). A espécie *P. chimonanthi* foi recentemente proposta por Chang e colaboradores (dados não publicados) para isolados antes denominados de *P. michaeliae*. Como esta espécie foi descrita em 1987 e aceita até o momento, no presente trabalho sugere-se que os isolados A113, A131, A133, ESIA1 e A321 sejam classificados como *P. michaeliae*.

O isolado ESIA1 foi obtido de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) enquanto os demais isolados deste clado foram obtidos de Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius*). Esses isolados apresentaram baixa similaridade genética quando avaliados por RAPD e similaridade parcial quanto às características morfológicas, uma vez que fazem parte do mesmo agrupamento no diâmetro da colônia em meio BDA (Grupo **C**) e MEA (Grupo **E**).



Os isolados ESRD1, ESKD1 e ESJE2 apresentaram homologia quanto as seqüências de ITS, com suporte de *bootstrap* de 95% (FIGURA 19). Entretanto, a figura 17 revela que por meio de marcadores RAPD, os isolados ESKD1 e ESJE2 são mais próximos, apresentando 92% de similaridade genética (com *bootstrap* de 65%) e 85% de similaridade desses isolados com o ESJE1. Assim, sugere-se que estes 3 isolados pertençam à mesma espécie. Entretanto, as seqüências ITS não apresentaram identidade superior a 90% com nenhuma seqüência depositada no GenBank. Assim, esses isolados foram denominados de *Phomopsis* sp. S1.



**FONTE:** O autor

FIGURA 20. ÁRVORE FILOGENÉTICA PARCIAL BASEADA NA SEQÜÊNCIA DA REGIÃO ITS1, 5,8S E ITS2 DO rDNA DOS ISOLADOS DE *Phomopsis* spp. (MODELO: NEIGHBOR-JOINING COM CORREÇÃO KIMURA DOIS PARÂMETROS)

O isolado PHO19 (patogênico de soja) foi classificado como *Phomopsis sojae*, formou um clado com um endófito não identificado (P3) e com um isolado da espécie *P. sojae* (FIGURA 19). O isolado *Phomopsis* sp. P3 foi obtido como endófito de *Tectona grandis* por Murali, Suryanarayanan e Geeta (2006).



Os isolados MU0123, SM9713 e *P. longicolla* (PHO1) apresentaram alta homologia das seqüências (clado suportado com 99% de *bootstrap*) (FIGURA 19). Os isolados SM9713 e *P. longicolla* (PHO1) apresentaram 89,3% de similaridade genética (com suporte de *bootstrap* de 100%) utilizando-se marcadores RAPD (FIGURA 17). Na análise morfológica os isolados MU0123 e SM9713 apresentaram mais de 70% de similaridade, porém, o isolado *P. longicolla* (PHO1) apresentou características morfológicas diferentes dos isolados MU0123 e SM9713 (FIGURA 11). O isolado PHO1 foi isolado como patógeno de soja (*Glycine max* (L.) Merr) no Mato Grosso, enquanto os isolados MU0123 e SM9713 foram obtidos como endofíticos de Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e Cajá (*Spondias mombin*), respectivamente, ambos no estado do Pará. Em função das similaridades genéticas observadas, e por ser o isolado PHO1 utilizado como referência de *P. longicolla*, os isolados endofíticos MU0123 e SM9713 foram identificados como pertencentes a esta espécie. A alta similaridade genética destes isolados sugere que pertençam à mesma espécie o que reforça as observações anteriores de que a definição de espécie do gênero *Phomopsis* não é possível utilizando-se apenas características morfológicas. O fato de isolados endofíticos de *S. mombin* e *M. urundeuva* serem identificados como *P. longicolla* demonstra que espécies patogênicas para um hospedeiro podem colonizar de forma assintomática diferentes espécies vegetais. Isso já foi observado para outros gêneros, como *Guignardia* e *Phyllosticta* (BAAYEN *et al.*, 2002, GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002).

Os endófitos ESBA1 e ES2AB1 foram reunidos no mesmo clado, sendo denominados de *Phomopsis* sp. S6 (FIGURA 19), esses isolados fazem parte do mesmo agrupamento utilizando-se marcadores RAPD (FIGURA 17).

Os isolados A323 e A334 apresentaram grande identidade genética (suportado com *bootstrap* de 70%) e seu agrupamento está representado na figura 19. Esses isolados não apresentaram identidade moderada a nenhuma das seqüências depositadas no GenBank, e portanto, não foi possível inferir sobre a espécie desses endófitos. Sugere-se que esses isolados de Aroeira pertençam à mesma espécie, e portanto, foram denominados de *Phomopsis* sp. S8. Os isolados ES2KF1, ES2WF1 e

ESPAC22 endófitos de Espinheira Santa foram reunidos num mesmo clado, sendo denominados de *Phomopsis* sp. S4 (FIGURA 19).

Os isolados A126 e ESJH1 foram reunidos no mesmo clado, sendo denominados de *Phomopsis* sp. S11, eles foram isolados de diferentes plantas hospedeiras. O isolado ESJH1 foi obtido de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) enquanto o isolado A126 foi obtido de Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius*). Estes resultados reforçam a dificuldade em inferir espécies do gênero *Phomopsis* com base na planta hospedeira.

Os isolados A116, A124, A123, ESGA1, ESJD1, ESDF1 e ESGF1 não apresentaram identidade com nenhuma seqüência depositada no GenBank, nem similaridade com outros isolados analisados no presente trabalho. Sugere-se que esses endófitos pertençam a diferentes espécies.

No último clado o isolado ESFH1 apresentou homologia com a região ITS1-rDNA 5,8S - ITS2 da espécie *P. theicola* (DQ286286 e DQ286287) e com o isolado SM9638 (FIGURA 19). Estes dois isolados foram obtidos de diferentes plantas hospedeiras. O isolado ESFH1 foi obtido em 2006 de *M. ilicifolia* no Paraná, enquanto o isolado SM9638 foi obtido em 1996 como endofítico da planta *Spondias mombin* no Estado do Pará. Esses isolados apresentam baixa similaridade morfológica (FIGURAS 11 e 12). Estes resultados reforçam a dificuldade em inferir espécies do gênero *Phomopsis* especialmente utilizando-se características morfológicas.

No presente trabalho observou-se que várias espécies de *Phomopsis* foram isoladas de um mesmo hospedeiro, assim como uma mesma espécie foi encontrada colonizando diferentes hospedeiros. Isto já foi relatado no gênero *Phomopsis* por Brayford (1990), Farr, Castlebury e Rossman (2002) e por Rehner e Uecker (1994). Esses resultados reforçam a necessidade de revisão do conceito de espécie para o gênero *Phomopsis*, uma vez que muitas espécies têm sido identificadas com base na planta hospedeira (GAMBOA-GAITÁN, LAUREANO e BAYMAN, 2005; MURALI, SURYANARAYANAN, GEETA, 2006).

Os dados morfológicos e de RAPD foram altamente variáveis, e a análise das seqüências da região ITS1- 5,8S - ITS2 do rDNA foi informativa para alguns dos

isolados analisados. Entretanto, mais estudos são necessários para a identificação precisa dessas espécies. A literatura é escassa quanto a trabalhos de taxonomia, morfologia, biologia e ecologia de isolados endofíticos do gênero *Phomopsis*. Segundo Phillips (2006) a identificação das espécies do gênero *Phomopsis* é difícil porque as espécies não estão claramente definidas e existe uma sobreposição entre os caracteres morfológicos que as definem.

A maioria das seqüências depositadas no GenBank são de isolados provenientes de lesões, sendo portanto de espécies patogênicas. No presente trabalho, é possível que os isolados pertencentes a clados que não se agruparam com nenhuma seqüência já depositada, pertençam a novas espécies, ou ainda a espécies de endófitos ainda não seqüenciados. Murali, Suryanarayanan e Geeta (2006) caracterizaram por meio de seqüenciamento da região ITS e dados morfológicos, 11 isolados endofíticos de *Phomopsis* obtidos de *Tectona grandis* e *Cassia fistula*. Eles sugerem que apesar da grande variabilidade encontrada, os isolados devem ser reunidos em apenas dois grupos, entretanto, não foi possível a identificação em nível de espécie. Segundo os autores, isto não foi possível em função dos fungos deste gênero não terem hospedeiros específicos e pela necessidade de revisão do conceito de espécie em *Phomopsis*.

Farr, Castlebury e Rossman (2002) caracterizaram por análise de seqüências ITS1, 5,8S, ITS2 e por características morfológicas, linhagens de *Phomopsis* sp. isolados de *Vaccinium corymbosum* e *V. macrocarpon*. Baseados nesse estudo verificaram que a maioria dos isolados tratava-se de *Phomopsis vaccinii*, uma vez que as seqüências agruparam-se com uma cultura referência dessa espécie.

Castlebury e Mengistu (2006) avaliaram *Phomopsis* isolados de soja e outros hospedeiros combinando dados de seqüências de ITS do rDNA, do gene do fator1 alfa de alongação da tradução (ef-1) e genes de actina. Foram formados seis grupos de *Phomopsis*, sendo que três correspondem aos táxons *P. longicolla*, *Diaporthe melonis* e *D. phaseolorum*. Os autores concluíram que a ausência de distinção morfológica e informação biológica tornam problemática a identificação de espécies deste gênero.

No presente trabalho, com base nos dados de RAPD (FIGURAS 17 e 18), pode-se sugerir a existência de pelo menos 10 espécies de *Phomopsis* colonizando de forma endofítica as plantas de *Maytenus ilicifolia* analisadas. Tais plantas são provenientes de um único pomar localizado no CNPF/EMPRAPA em Colombo/PR. Ainda, é possível sugerir a existência de pelo menos seis espécies de *Phomopsis* colonizando de forma endofítica a planta de *S. terebinthifolius* analisada neste trabalho. Esta planta não recebeu qualquer tratamento com fungicidas ou outro agrotóxico, uma vez que se encontra isolada entre dois blocos do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (ANEXO 13). Talvez isso justifique a grande diversidade de isolados encontrada. Esses dados demonstram a importância de estudos da comunidade endofítica em plantas medicinais e apontam para o problema da redução de diversidade de microrganismos endofíticos pelo uso continuado de fungicidas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gamboa-Gaitán, Laureano e Bayman (2005) estudando isolados de *Phomopsis* endofíticos da planta medicinal *Guarea guidonia* (Meliaceae). Os autores relataram elevados níveis de variabilidade genética, avaliada pela digestão da região ITS e também a alta variabilidade morfológica, entre os isolados avaliados. A árvore molecular agrupou indivíduos fenotipicamente diferentes. Por outro lado, Fernandez e Hanlin (1996) obtiveram resultados concordantes entre a análise molecular por RAPD e as características morfoculturais, separando os isolados coletados de soja em dois grupos: *Diaporthe phaseolorum* e *Phomopsis longicolla*.

Pioli *et al.* (2003) caracterizaram por RAPD, isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* coletados de soja, na Argentina. Eles foram separados em quatro grupos (i) *Diaporthe phaseolorum* variedade meridionalis, (ii) *D. phaseolorum* variedade caulivora, (iii) *D. phaseolorum* variedade sojæ, and (iv) *Phomopsis longicolla*, revelando a existência de variabilidade entre isolados da mesma variedade.

## 5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

### 5.4.1 Cultura pareada

Os isolados de *Phomopsis* foram avaliados pela técnica de cultura pareada contra as linhagens PC13/96 e PC33/05 do fitopatógeno *G. citricarpa*. As interações foram 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. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

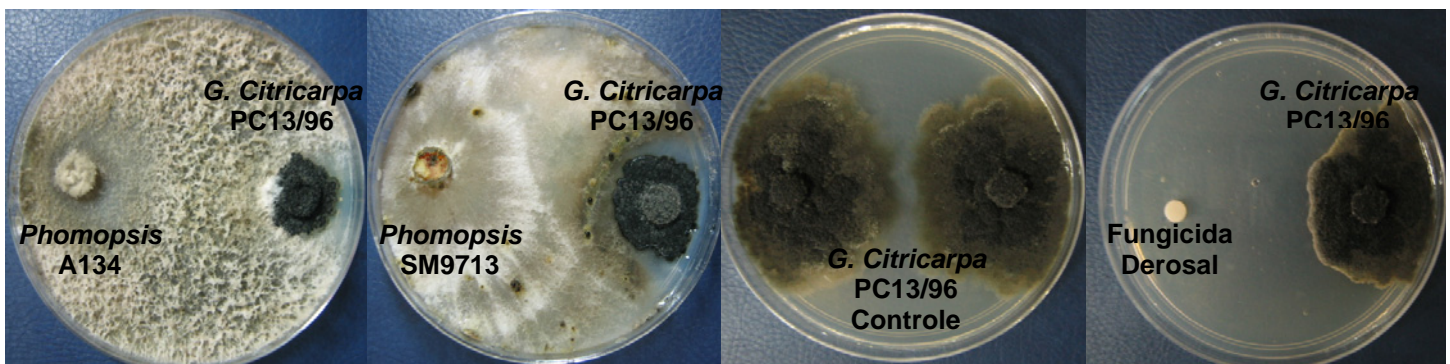
Todos os isolados de *Phomopsis* inibiram significativamente o crescimento das duas linhagens de *Guignardia*, exceto o isolado ES2WC1 (*Phomopsis* sp.), que apresentou interação do tipo 3, em que não houve inibição significativa do fitopatógeno, apenas 2,87% e 8,28% contra PC13/96 e PC33/05 respectivamente (ANEXO 6, 7, 8 e 9). Foi observado que as duas linhagens de *G. citricarpa* apresentaram o mesmo tipo de interação frente ao mesmo isolado de *Phomopsis*, ou seja, não houve variação quanto a linhagem do fitopatógeno avaliado. Tal observação reforça a importância dos resultados aqui apresentados.

Dos 49 isolados de *Phomopsis*, endófitos de plantas medicinais, avaliados 38 inibiram o crescimento das duas linhagens do fitopatógeno *G. citricarpa* com porcentagem de inibição superior a 50%. Os isolados A333B (*Phomopsis* sp.), ESGF1 (*Phomopsis* sp. S3), SM9638 (*P. theicola*), AT9810 (*Phomopsis* sp.), AT9906 (*Phomopsis* sp.) e ES2WC1 (*Phomopsis* sp.) apresentaram taxas de inibição inferiores a 50% contra PC13/96 e PC33/05, os isolados ES80J (*Phomopsis* sp.) e AT9811 (*Phomopsis* sp.) apresentaram taxas de inibição inferiores a 50% apenas contra a linhagem PC13/96, enquanto contra a PC33/05 a inibição foi de 51,32% e 53,97% respectivamente. Por outro lado, os isolados de *Phomopsis* ESFF1 (*Phomopsis* sp.), SM9714 (*Phomopsis* sp.) e A132 (*Phomopsis* sp.) apresentaram taxas de inibição inferiores a 50% apenas contra a linhagem PC33/05, enquanto contra PC13/96 a inibição foi de 50,17%, 62,15% e 54,92% respectivamente.

A análise estatística demonstrou que há diferença significativa entre o controle e os isolados avaliados. O fungicida Derosal apresentou inibição do crescimento do fitopatógeno em aproximadamente 19%, todos os isolados de *Phomopsis* que apresentaram inibição superior ao fungicida com significância no teste estatístico exceto o isolado ES2WC1 (*Phomopsis* sp.) como citado anteriormente (TABELA 8 e 9; ANEXO 6, 7, 8 e 9).

As interações do tipo 1, nas quais ocorre a sobreposição de hifas do endófito sobre o fitopatógeno, sugere a ocorrência de parasitismo. Esse tipo de interação entre os isolados de *Phomopsis* e as linhagens de *G. citricarpa* ocorreu em 47% dos isolados. Tais isolados apresentam diferença significativa entre o controle, destacando-se os isolados ESDF1 (*Phomopsis* sp. S7), A134 (*Phomopsis* sp.) (FIGURA 21), ESJD1 (*Phomopsis* sp. S12) e ESJH1 (*Phomopsis* sp. S11), que inibiram o crescimento de *G. citricarpa* PC13/96 em 73,38%, 68,85%, 68,26% e 67,92% respectivamente. A análise estatística demonstra que há diferença significativa entre o controle e estes isolados, porém não há diferença significativa entre os mesmos (ANEXO 6, 7 e 8).

As interações do tipo 2, nas quais não ocorre sobreposição de hifas, ocorreram em 51% dos isolados, destacando-se os isolados ESSD1 (*Phomopsis* sp.) e SM9713 (*P. longicolla*) que inibiram o crescimento da linhagem PC13/96 de *G. citricarpa* em 73,24% e 67,63% respectivamente. A análise estatística demonstra que há diferença significativa entre o controle e os isolados ESSD1 (*Phomopsis* sp.) e SM9713 (*P. longicolla*), os isolados de *Phomopsis* também diferem entre si (TABELA 8). Essas interações devem ser avaliadas posteriormente em microscopia ótica para confirmar se está ocorrendo parasitismo.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 21.** INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Phomopsis* CONTRA *Guignardia citricarpa* PC13/96 PELA TÉCNICA DE CULTURA PAREADA

TABELA 8. PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO E TIPOS DE INTERAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* E *Guignardia citricarpa* – PC13/96

Isolados	Identificação	Tipo de Interação	Inibição (%)
Fungicida*			19
ESDF1	<i>Phomopsis</i> sp. S7	1	73,38
ESSD1	<i>Phomopsis</i> sp.	2	73,24
A134	<i>Phomopsis</i> sp.	1	68,85
ESJD1	<i>Phomopsis</i> sp. S12	1	68,26
ESJH1	<i>Phomopsis</i> sp. S11	1	67,92
SM9713	<i>P. longicolla</i>	2	67,63
ESIE1	<i>Phomopsis</i> sp.	1	67,58
ESFB2	<i>Phomopsis</i> sp.	1	67,24
MU0123	<i>P. longicolla</i>	2	66,63
ESRD1	<i>Phomopsis</i> sp. S1	2	66,55
ESJG1	<i>Phomopsis</i> sp.	2	66,21
ESJE1	<i>Phomopsis</i> sp. S1	1	66,21
ESPAC22	<i>Phomopsis</i> sp. S4	1	65,16
A131	<i>P. michaeliae</i>	2	63,93
A126	<i>Phomopsis</i> sp. S11	1	63,52
A123	<i>Phomopsis</i> sp. S2	1	62,70
A113	<i>P. michaeliae</i>	1	62,70
SM9631	<i>Phomopsis</i> sp.	1	62,65
ES2AB1	<i>Phomopsis</i> sp. S6	1	62,46
ESJE2	<i>Phomopsis</i> sp. S1	1	62,46
A323	<i>Phomopsis</i> sp. S8	1	62,30
SM9714	<i>Phomopsis</i> sp.	1	62,15
ES2NA1	<i>Phomopsis</i> sp.	1	62,12
A334	<i>Phomopsis</i> sp. S8	1	61,89
ESBA1	<i>Phomopsis</i> sp. S6	2	61,77
A321	<i>P. michaeliae</i>	1	61,48
ESKD1	<i>Phomopsis</i> sp. S1	1	61,09
A216B	<i>Phomopsis</i> sp.	2	60,25
ES2KF1	<i>Phomopsis</i> sp. S4	2	59,39
ESIA1	<i>P. michaeliae</i>	2	59,04
A135	<i>Phomopsis</i> sp.	2	59,02
A124	<i>Phomopsis</i> sp. S9	2	58,61
A115B	<i>Phomopsis</i> sp.	1	58,61
A116	<i>Phomopsis</i> sp. S5	2	58,20
A215A	<i>Phomopsis</i> sp.	1	56,56
A132	<i>Phomopsis</i> sp.	2	54,92
ESFH1	<i>P. theicola</i>	2	54,27
A333A	<i>Phomopsis</i> sp.	1	53,69
ESGA1	<i>Phomopsis</i> sp. S10	2	53,24
ES2WF1	<i>Phomopsis</i> sp. S4	2	52,05
ESFF1	<i>Phomopsis</i> sp.	2	50,17
AT9811	<i>Phomopsis</i> sp.	1	49,20
ESGF1	<i>Phomopsis</i> sp. S3	2	46,42
SM9638	<i>P. theicola</i>	1	45,22
A333B	<i>Phomopsis</i> sp.	1	44,26
ES80J	<i>Phomopsis</i> sp.	2	43,44
AT9810	<i>Phomopsis</i> sp.	2	41,73
AT9906	<i>Phomopsis</i> sp.	2	30,78
ES2WC1	<i>Phomopsis</i> sp.	3	2,87

FONTE: O autor

A interação do tipo 1 entre os isolados de *Phomopsis* e a linhagem PC33/05 de *G. citricarpa* ocorreu em 47% dos isolados, a redução do crescimento do fitopatógeno apresentou diferença significativa quando comparados com o controle, destacando-se os isolados A215A (*Phomopsis* sp.), A115B (*Phomopsis* sp.), ESDF1 (*Phomopsis* sp. S7), ESJD1 (*Phomopsis* sp. S12), A123 (*Phomopsis* sp. S2) que inibiram o crescimento da linhagem PC33/05 de *G. citricarpa* em 79,47%, 76,16%, 71,52%, 71,19% e 71,19% respectivamente (TABELA 9, FIGURA 22). A análise estatística demonstra que há diferença significativa entre o controle e os isolados A215A (*Phomopsis* sp.), A115B (*Phomopsis* sp.), ESDF1 (*Phomopsis* sp. S7), ESJD1 (*Phomopsis* sp. S12), A123 (*Phomopsis* sp. S2) A215A, A115B, ESDF1, ESJD1, A123, mas os isolados de *Phomopsis* não diferem entre si (ANEXO 9).

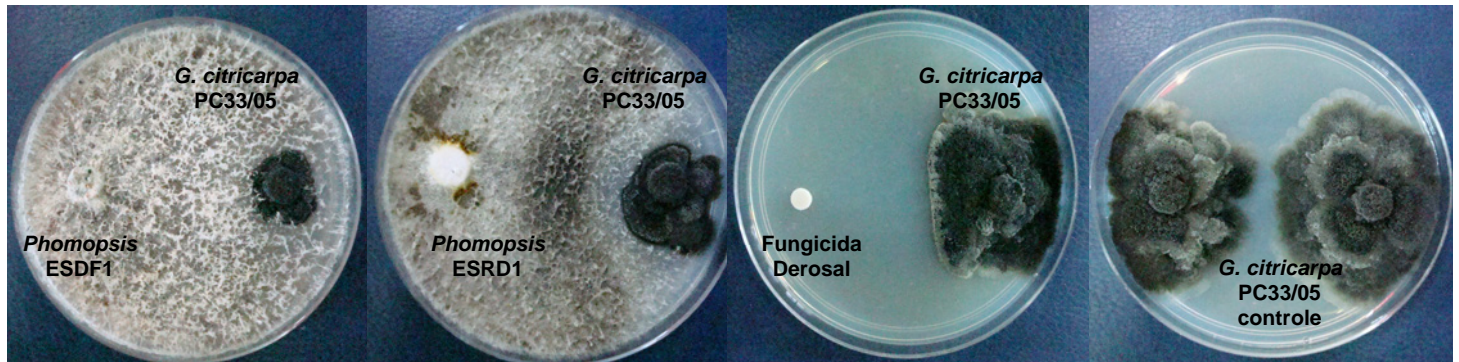
Os isolados ESRD1 (*Phomopsis* sp. S1) e A135 (*Phomopsis* sp) apresentaram as maiores taxas de inibição do crescimento da linhagem PC33/05 de *G. citricarpa* pela interação do tipo 2, 68,87 e 66,23% respectivamente (TABELA 9). A análise estatística demonstra que há diferença significativa entre o controle e os isolados ESRD1 (*Phomopsis* sp. S1) e A135 (*Phomopsis* sp.), esses isolados de *Phomopsis* diferem entre si (ANEXO 9). Essas interações devem ser avaliadas posteriormente ao microscópio para confirmar se está ocorrendo parasitismo.

O isolado SM9713 (*P. longicolla*) inibiu o crescimento do patógeno *G. citricarpa* e produziu esporos em volta da colônia. Segundo Boosalis (1964) a esporulação pode ocorrer quando determinados hospedeiros estimulam a reprodução de seus parasitas. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins-Corder e Melo (1998), onde observaram que a maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas colonizou e produziu esporos em abundância sobre as colônias de *Verticillium dahliae*.

As interações do tipo 2 mostram inibição mútua, na qual o endófito não sobrepõe a colônia do fitopatógeno, apesar de inibir seu crescimento. Segundo Bell *et al.* (1982), os antagonistas selecionados pelo confronto direto, são aqueles que apresentam crescimento sobre o fitopatógeno. Porém, a relação entre o tipo de interação e a porcentagem de inibição observada nos resultados não são congruentes, uma vez que



a porcentagem de inibição para alguns isolados com interação do Tipo 2 é maior do que para aqueles com interação do Tipo 1.



FONTE: O autor

FIGURA 22. INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Phomopsis* CONTRA *Guignardia citricarpa* 33/05 PELA TÉCNICA DE CULTURA PAREADA

TABELA 9. PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO E TIPOS DE INTERAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* E *Guignardia citricarpa* – PC33/05 (CONTINUA)

Isolados	Identificação	Tipo de Interação	Inibição (%)
Fungicida			19,21
A215A	<i>Phomopsis</i> sp.	1	79,47
A115B	<i>Phomopsis</i> sp.	1	76,16
ESDF1	<i>Phomopsis</i> sp. S7	1	71,52
ESJD1	<i>Phomopsis</i> sp. S12	1	71,19
A123	<i>Phomopsis</i> sp. S2	1	71,19
ESFB2	<i>Phomopsis</i> sp.	1	70,86
ESJE2	<i>Phomopsis</i> sp. S1	1	70,20
ESJH1	<i>Phomopsis</i> sp. S11	1	70,20
SM9631	<i>Phomopsis</i> sp.	1	69,21
ESRD1	<i>Phomopsis</i> sp. S1	2	68,87
A135	<i>Phomopsis</i> sp.	2	66,23
A126	<i>Phomopsis</i> sp. S11	1	64,90
ESPAC22	<i>Phomopsis</i> sp. S4	1	64,24
A131	<i>P. michaeliae</i>	2	64,24
ESJE1	<i>Phomopsis</i> sp.	1	63,58
ES2KF1	<i>Phomopsis</i> sp. S4	2	62,98
A334	<i>Phomopsis</i> sp. S8	1	62,91
A124	<i>Phomopsis</i> sp. S9	2	62,58
ESIA1	<i>P. michaeliae</i>	2	61,26
ESKD1	<i>Phomopsis</i> sp. S1	1	59,93
ESSD1	<i>Phomopsis</i> sp. L5	2	59,60
A134	<i>Phomopsis</i> sp.	1	58,61
A113	<i>P. michaeliae</i>	1	57,95

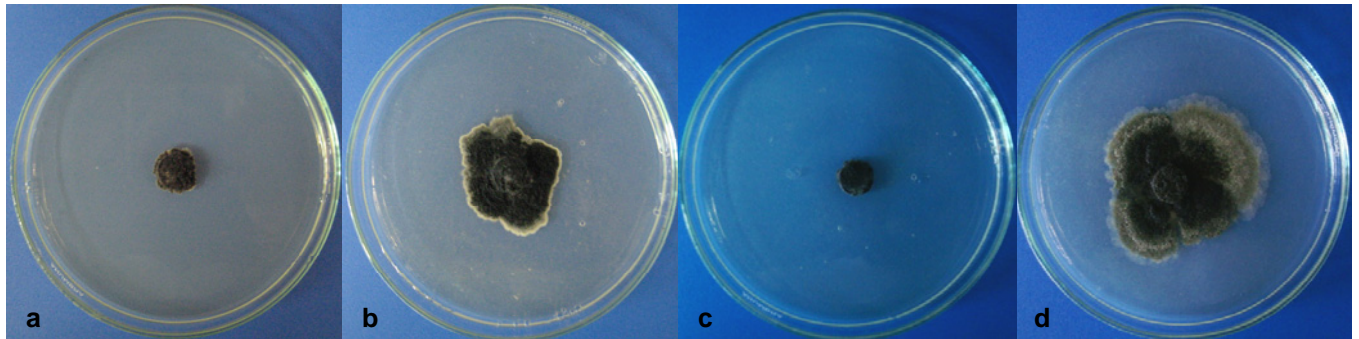
TABELA 9. PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO E TIPOS DE INTERAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* E *Guignardia citricarpa* – PC33/05 (CONTINUAÇÃO)

<b>A333A</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	1	57,28
<b>ESIE1</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	1	56,95
<b>ESJG1</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	2	56,62
<b>A323</b>	<i>Phomopsis</i> sp. S8	1	56,29
<b>ES2AB1</b>	<i>Phomopsis</i> sp. S6	1	55,96
<b>ESBA1</b>	<i>Phomopsis</i> sp. S6	2	55,63
<b>A116</b>	<i>Phomopsis</i> sp. S5	2	54,64
<b>AT9811</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	1	53,97
<b>A216B</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	2	53,64
<b>A321</b>	<i>P. michaeliae</i>	1	53,31
<b>SM9713</b>	<i>P. longicolla</i>	2	52,98
<b>ES2NA1</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	1	52,65
<b>MU0123</b>	<i>P. longicolla</i>	2	52,32
<b>ESFH1</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	2	51,32
<b>ES80J</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	2	51,32
<b>ESGA1</b>	<i>Phomopsis</i> sp. S10	2	50,79
<b>ES2WF1</b>	<i>Phomopsis</i> sp. S4	2	50,33
<b>ESFF1</b>	<i>P. theicola</i>	2	49,34
<b>SM9714</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	1	47,35
<b>A132</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	2	44,70
<b>A333B</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	1	37,75
<b>ESGF1</b>	<i>Phomopsis</i> sp. S3	2	33,44
<b>SM9638</b>	<i>P. theicola</i>	1	27,81
<b>AT9810</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	2	26,49
<b>AT9906</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	2	25,83
<b>ES2WC1</b>	<i>Phomopsis</i> sp.	3	8,28

FONTE: O autor

#### 5.4.2 Teste para detecção de metabólitos não voláteis

No teste de metabólitos voláteis observou-se redução do crescimento da linhagem PC13/96 e PC33/05 de *G. citricarpa* após a retirada do celofane onde inicialmente foram inoculados os isolados de *Phomopsis*. Todos os isolados testados inibiram significativamente o crescimento das duas linhagens de *G. citricarpa*. Os isolados A115B (*Phomopsis* sp.), A134 (*Phomopsis* sp.), ESFF1 (*Phomopsis* sp.), ESFH1 (*Phomopsis theicola*), A123 (*Phomopsis* sp. S2) e S2WF1 (*Phomopsis* sp. S4) apresentaram maior inibição do crescimento das duas linhagens do fitopatógeno (ANEXO 10 e 11 e FIGURA 23), sugerindo que a interação entre os isolados de *Phomopsis* e o fitopatógeno ocorre devido à produção de metabólitos não voláteis.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 23.** AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96 e PC33/05 INOCULADAS APÓS RETIRADA DO PAPEL CELOFANE PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS EM MEIO BDA, APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C

Nota: **a.** Placa com o fitopatógeno *G. citricarpa* PC33/05 inoculado após retirada do celofane onde previamente foi inoculado o isolado ESFH1; **b.** Placa controle com o fitopatógeno *G. citricarpa* PC33/05; **c.** Placa com o fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96 inoculado após retirada do celofane onde previamente foi inoculado o isolado ESFH1; **d.** Placa controle com o fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96.

FIGUEIREDO (2006) utilizou a técnica de metabólitos não voláteis em *Pestalotiopsis* isolados endofíticos de *Maytenus ilicifolia* e observou uma redução do crescimento da linhagem PC13/96 de *G. citricarpa*, demonstrando que a interação ocorre principalmente pela produção de metabólitos não voláteis.

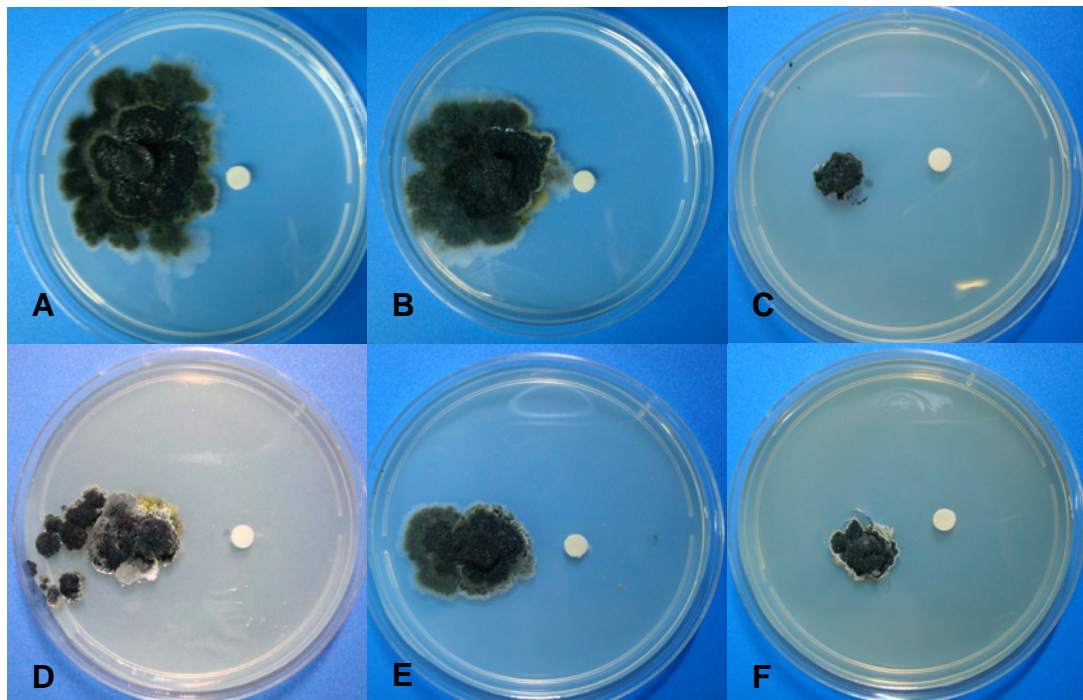
Os resultados apresentados aqui demonstram o grande potencial que tais linhagens endofíticas de *Phomopsis* possuem como agentes de controle da Mancha Preta dos Citros e o seu potencial na produção de metabólitos.

#### 5.4.3 Avaliação da ação dos Extratos

Na avaliação dos extratos quanto à inibição do crescimento das linhagens PC13/96 e PC33/05 de *G. citricarpa* os resultados indicam que a maioria dos extratos metanólicos produzidos a partir dos isolados de *Phomopsis* reduziram o crescimento micelial de ambas as linhagens do fitopatógeno da MPC. A inibição ocorreu devido aos metabólitos secundários produzidos pelos isolados endofíticos, quando comparados com o crescimento micelial dos controles; com metanol (onde o extrato foi diluído) e com água destilada (FIGURA 24, 25 e TABELA 10).

Foi observado que os isolados de *Phomopsis* que apresentaram as maiores porcentagens de inibição pela técnica de cultura pareada também inibiram o crescimento quando foi utilizado o extrato metanólico. Entretanto, o isolado ES2WC1 (*Phomopsis* sp.) que não inibiu o crescimento pela técnica de cultura pareada apresentou redução no crescimento micelial dos dois fitopatógenos avaliados utilizando-se o seu extrato metanólico. Provavelmente essa falta de inibição pela técnica de cultura pareada tenha ocorrido pelo fato do isolado ES2WC1 (*Phomopsis* sp.) apresentar crescimento lento, fazendo com que o crescimento do fitopatógeno não diferisse significativamente do controle.

Os isolados ES80J (*Phomopsis* sp.), ESFF1 (*Phomopsis* sp.), A132 (*Phomopsis* sp.), A333B (*Phomopsis* sp.) e SM9638 (*P. theicola*) não inibiram o crescimento micelial de nenhum dos fitopatógenos avaliados. Para alguns isolados de *Phomopsis* não foi possível determinar o potencial antimicrobiano dos extratos metanólicos, pois houve grande variação de ação entre as repetições do experimento.

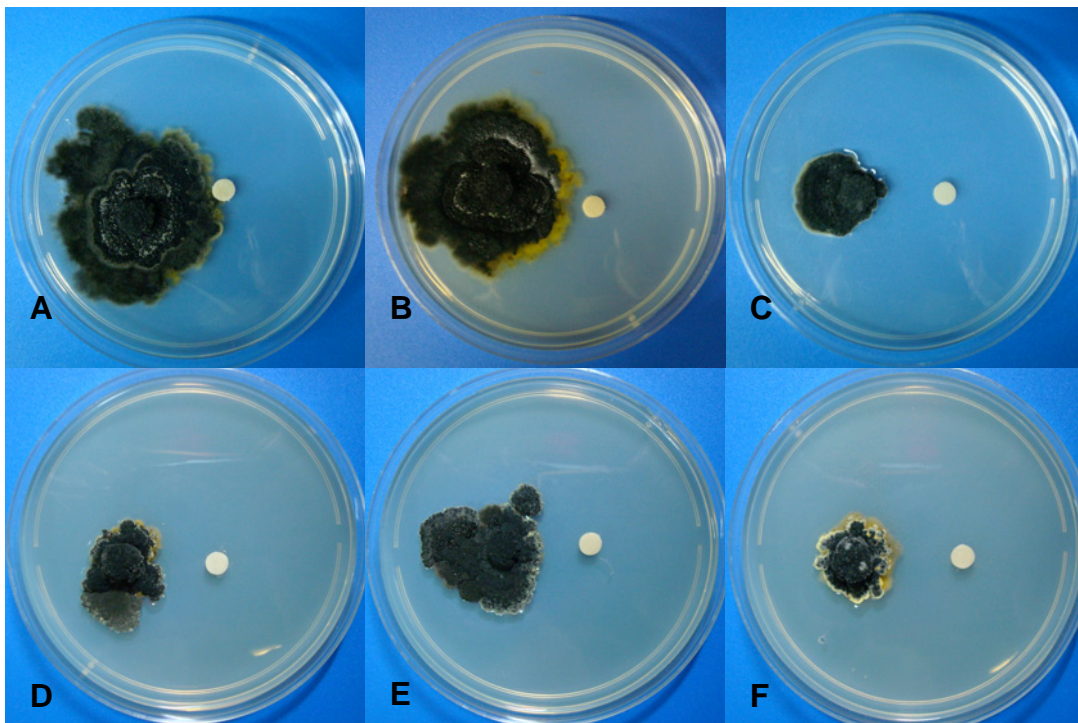


**FONTE:** O autor

**FIGURA 24.** AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DA LINHAGEM PC33/05 DE *G. citricarpa* EM MEIO BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C

**NOTA:** **A:** Placa controle com água destilada autoclavada; **B:** Placa controle com metanol; **C:** Placa controle com fungicida Derosal<sup>®</sup> (1,0 mg/mL); **D:** Placa com extrato metanólico do isolado ES2WC1; **E:** Placa com extrato metanólico do isolado A215A; **F:** Placa com extrato metanólico do isolado ESDF1;

Rodrigues-Heerklotz *et al.* (2001) elucidaram a estrutura química e a síntese assimétrica de um novo metabólito, o ácido guignardico produzido pelo fungo endofítico *Guignardia* sp, isolado de *Spondias mombin*. Silva *et al.* (2005) isolaram dois metabólitos de *Phomopsis cassiae* endofítico de *Cassia specatabilis*, 2,4-diidroxi-5,6-dimetil benzoato de etila e phomopsilactona, que exibiram forte atividade antifúngica contra fitopatógenos, bem como citotoxicidade contra a linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa). Estudos adicionais devem ser realizados para determinar a estrutura química produzida pelos endófitos de *Phomopsis* estudados.



**FONTE:** O autor

**FIGURA 25.** AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DA LINHAGEM PC13/96 DE *G. citricarpa* EM MEIO BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C

**NOTA:** **A:** Placa controle com água destilada autoclavada; **B:** Placa controle com metanol; **C:** Placa controle com fungicida Derosal<sup>®</sup> (1,0 mg/mL); **D:** Placa com extrato metanólico do isolado ES2WC1; **E:** Placa com extrato metanólico do isolado ESGA1; **F:** Placa com extrato metanólico do isolado ESSD1.

Os resultados da tabela 10 revelam que os isolados endofíticos de *Phomopsis* spp. avaliados, são bastante promissores, demonstrando um potencial na produção de metabólitos. Resultados semelhantes foram obtidos por Moller, Weber e Dreyfuss (1996) que avaliaram a ação de endófitos de plantas tropicais com alta produção de metabólitos secundários.

TABELA 10. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DA LINHAGEM PC13/96 E PC33/05 DE *G. citricarpa* EM MEIO BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C (CONTINUA)

Identificação	Isolados	Inibição PC33/05 Cultura Pareada	Inibição PC33/05 Extrato Metanólico	Inibição (%) PC13/96 Cultura Pareada	Inibição PC13/96 Extrato Metanólico
Derosal	Fungicida	19,21		19	
<i>P. longicolla</i>	SM9713	52,98		67,63	
<i>P. longicolla</i>	MU0123	52,32	ND	66,63	
<i>P. michaeliae</i>	A131	64,24		63,93	
<i>P. michaeliae</i>	ESIA1	61,26		59,04	
<i>Phomopsis</i> sp.	A333A	57,28		53,69	
<i>P. michaeliae</i>	A321	53,31		61,48	
<i>P. michaeliae</i>	A113	57,95	ND	62,7	ND
<i>Phomopsis</i> sp. S2	A123	71,19	ND	62,7	ND
<i>P. theicola</i>	ESFH1	51,32		54,27	
<i>Phomopsis</i> sp.	ESFF1	49,34	NI	50,17	NI
<i>P. theicola</i>	SM9638	27,81	NI	45,22	NI
<i>Phomopsis</i> sp. S4	ES2WF1	50,33		52,05	
<i>Phomopsis</i> sp. S3	ESGF1	33,44		46,42	
<i>Phomopsis</i> sp. S10	ESGA1	50,79		53,24	
<i>Phomopsis</i> sp. S1	ESRD1	68,87		66,55	
<i>Phomopsis</i> sp. S8	A334	62,91		61,89	
<i>Phomopsis</i> sp. S9	A124	62,58		58,61	
<i>Phomopsis</i> sp. S7	ESDF1	71,52		73,38	
<i>Phomopsis</i> sp.	ESSD1	59,6		73,24	
<i>Phomopsis</i> sp. S6	ES2AB1	55,96		62,46	
<i>Phomopsis</i> sp. S6	ESBA1	55,63		61,77	
<i>Phomopsis</i> sp. S11	A126	64,9	ND	63,52	ND
<i>Phomopsis</i> sp. S12	ESJD1	71,19		68,26	
<i>Phomopsis</i> sp. S1	ESJE1	63,58		66,21	
<i>Phomopsis</i> sp. S1	ESJE2	70,2	ND	62,46	ND
<i>Phomopsis</i> sp. S1	ESKD1	59,93	ND	61,09	ND
<i>Phomopsis</i> sp.	A115B	76,16		58,61	
<i>Phomopsis</i> sp.	ESFB2	70,86		67,24	
<i>Phomopsis</i> sp. S11	ESJH1	70,2		67,92	
<i>Phomopsis</i> sp.	A135	66,23		59,02	ND
<i>Phomopsis</i> sp.	A134	58,61		68,85	
<i>Phomopsis</i> sp.	ESIE1	56,95		67,58	
<i>Phomopsis</i> sp.	ESJG1	56,62	ND	66,21	

TABELA 10. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICOS NO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DA LINHAGEM PC13/96 E PC33/05 DE *G. citricarpa* EM MEIO BDA, APÓS 14 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C (CONTINUAÇÃO)

<i>Phomopsis</i> sp.	AT9811	53,97		49,2	
<i>Phomopsis</i> sp.	A216B	53,64		60,25	
<i>Phomopsis</i> sp.	ES2NA1	52,65		62,12	
<i>Phomopsis</i> sp.	SM9714	47,35		62,15	
<i>Phomopsis</i> sp.	ES2WC1	8,28		2,87	
<i>Phomopsis</i> sp.	SM9631	69,21	ND	62,65	ND
<i>Phomopsis</i> sp. S4	ESPAC22	64,24	ND	65,16	ND
<i>Phomopsis</i> sp. S4	ES2KF1	62,98	ND	59,39	ND
<i>Phomopsis</i> sp. S8	A323	56,29	ND	62,3	ND
<i>Phomopsis</i> sp. S5	A116	54,64	ND	58,2	ND
<i>Phomopsis</i> sp.	AT9810	26,49	ND	41,73	ND
<i>Phomopsis</i> sp.	AT9906	25,83	ND	30,78	ND
<i>Phomopsis</i> sp.	ES80J	51,32	NI	43,44	NI
<i>Phomopsis</i> sp.	A132	44,7	NI	54,92	NI
<i>Phomopsis</i> sp.	A333B	37,75	NI	44,26	NI
<i>Phomopsis</i> sp.	A215A	79,47		56,56	

**FONTE:** O autor

**NOTA:** I- Inibição do crescimento do fitopatógeno. NI- Não ocorreu inibição do fitopatógeno. ND- Não foi determinado a inibição.

No Brasil as plantas *Spondias mombin* e *A. tomentosum* têm sido usadas na medicina devido as suas propriedades antimicrobianas (AJAO, SHONUKAN e FEMI, 1984). Os isolados de *Phomopsis* obtidos como endófitos de *S. mombin* (SM9713 (*P. longicolla*), SM9638 (*P. theicola*) e SM9714 (*Phomopsis* sp.)) e *A. tomentosum* (AT9810 (*Phomopsis* sp.), AT9811 (*Phomopsis* sp.) e AT9906 (*Phomopsis* sp.)), avaliados no presente trabalho, já haviam sido relatados por Corrado e Rodrigues (2004) como produtores de compostos bioativos. Os autores relatam que os extratos metanólicos inibiram o crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* e *F. oxysporum*. No presente trabalho, os isolados de *S. mombin* e *A. tomentosum* inibiram o crescimento de *Guignardia citricarpa* confirmando o potencial desses isolados em produzir substâncias bioativas, mais estudos devem ser realizados para verificar o potencial antimicrobiano desses extratos contra bactérias patogênicas e fitopatogênicas.

A planta *Schinus terebinthifolius* é usada no Brasil na medicina alternativa contra doenças da córnea (CORRÊA, 1926), doenças reumáticas, úlceras, feridas, tumores linfáticos, erisipela e outras moléstias provocadas por bactérias que se manifestam em forma de edema ou eritema (BALBACH, 1992). As linhagens de *Phomopsis* isoladas de *S. terebinthifolius* avaliadas nesse trabalho A135 (*Phomopsis* sp.), A113 (*P. michaelae*),

A115B (*Phomopsis* sp.), A323 (*Phomopsis* sp. S8), A132 (*Phomopsis* sp), A134 (*Phomopsis* sp.), A333B (*Phomopsis* sp.), A321 (*P. michaelae*), A126 (*Phomopsis* sp. S11), A216B (*Phomopsis* sp.), A334 (*Phomopsis* sp. S8), A116 (*Phomopsis* sp. S5), A215A (*Phomopsis* sp.), A124 (*Phomopsis* sp. S9), A333A (*Phomopsis* sp.), A131 (*P. michaeliae*) e A123 (*Phomopsis* sp. S2) apresentaram excelentes resultados contra *G. citricarpa*.

Extratos da planta *M. ilicifolia* já foram descritos na literatura apresentando atividade antitumoral, também usado como analgésico, antiinflamatório e antiácido (JORGE, 2004; DUARTE, 2005). Pileggi (2006) isolou microrganismos endofíticos de plantas de *Maytenus ilicifolia* do mesmo pomar investigado neste trabalho, e avaliou o potencial farmacológico dos mesmos. Entre os fungos e bactérias testados 15 apresentaram potencial para controle biológico.

Figueiredo (2006) isolou fungos endofíticos de plantas de *M. ilicifolia* do mesmo pomar investigado neste trabalho, especialmente *Pestalotiopsis* spp e os avaliou quanto ao potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas em humanos e o fitopatógeno *G. citricarpa*. Os extratos metanólicos de dois isolados exibiram ação fungistática na germinação e no crescimento micelial das linhagens PC13/96 e PC33/05 de *G. citricarpa*. Além disso, dois extratos de *Pestalotiopsis* spp. inibiram o crescimento dos microrganismos-teste (*S. aureus* oxalino resistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*).

No presente trabalho observou-se que as linhagens de *Phomopsis* spp. isolados de *M. ilicifolia* apresentaram excelentes resultados *in vitro* contra *G. citricarpa*. Pouco se conhece a respeito da comunidade endofítica existente nessas plantas e os resultados desse trabalho demonstram que abrigam uma grande variabilidade de PC13/96 e PC33/05 espécies de *Phomopsis* com potencial para bioprospecção. Isto reforça a importância de estudos de microrganismos endofíticos em plantas medicinais, em especial *M. ilicifolia* e *S. terebinthifolius*. Faz-se necessário também, o estudo da composição química dos extratos avaliados.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- As espécies de *Phomopsis* analisadas não podem ser identificadas apenas por características morfológicas ou marcadores moleculares RAPD, sendo necessária uma análise polifásica incluindo seqüenciamento de várias regiões do genoma;
- As plantas medicinais analisadas são colonizadas por grande diversidade de espécies de *Phomopsis* com grande variabilidade morfológica e genética intra e interespecíficas;
- As plantas de *Maytenus ilicifolia* analisadas são colonizadas endofiticamente por pelo menos 10 espécies de *Phomopsis*, sendo possível identificar por seqüências ITS do rDNA isolados de *P. theicola* e *P. michaeliae*;
- A planta de *Schinus terebinthifolius* analisada é colonizada endofiticamente por pelo menos 6 espécies de *Phomopsis*, sendo possível identificar por seqüências ITS do rDNA isolados de *P. michaeliae*;
- As espécies de *Phomopsis* analisadas não são hospedeiro-específicas, sendo necessária a redefinição do conceito de espécie para este gênero;
- Os isolados de *Phomopsis* spp. apresentaram grande potencial no controle *in vitro* do fungo *G. citricarpa*; Os isolados ESIA1 e A131 (*P. michaeliae*), ESJE1, ESJE2, ESKD1 e ESRD1 (*Phomopsis* sp. S1), A123 (*Phomopsis* sp. S2), ES2KF1 e ESPAC22 (*Phomopsis* sp. S4), ESDF1

(*Phomopsis* sp. S7), A334 (*Phomopsis* sp. S8), A124 (*Phomopsis* sp. S9), A126 e ESJH1 (*Phomopsis* sp. S11), ESJD1 (*Phomopsis* sp. S12) e os isolados A134, A135, A115B, A215A, SM9631, ESFB2 e ESSD1 (*Phomopsis* sp.), foram os mais promissores em inibir o crescimento das linhagens PC13/96 e PC33/05 de *G. citricarpa* nas metodologias avaliadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. 4ª ed. New York: Garland Publishing. 2004.
- ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. A. B.; JOSÉ, K. F. D. Plantas medicinais de uso popular: **Atlas farmacognóstico**. Canoas: Editora da ULBRA, 1995.
- ALZATE-MARIN, A. L.; BAÍA, G. S. FALEIRO, F. G. CARVALHO, G. A.; PAULA JR., T. J.; MOREIRA, M. A. BARROS, E. G. Análise da diversidade genética de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões do Brasil por marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 85-88, 1997.
- ALMEIDA, A. M. R. Efeito de luz e meios de cultura sobre crescimento micelial, formação e tamanho de picnídios e esporulação de isolados de *Phomopsis sojae* Leh.. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, Brasília, 2., 1981, Londrina. **Anais ...** Brasília: Embrapa/SNI, 1982. p. 216-226.
- ANCHORENA-MATIENZO, P. **Re-identificação e caracterização genética de levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. 2002. 81p. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, USP, Piracicaba, São Paulo, 2002.
- ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A.; GUIMARÃES, D. P. Ocorrência de Queima das Folhas Causada por *Phomopsis* sp. Em Aroeira No Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 649-650, 2001.
- ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 4, p. 447-451, 2000.
- ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; LIMA, A. O. S.; MARCOM, J.; SOBRAL, J. L.; LACAVA, P. T. **Manual: Isolamentos de fungos endofíticos**. Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- ARNOLD, E. A.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **PNAS**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. **Editora EMBRAPA**, Jaguariúna-SP. p. 117-137, 1998
- AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W. M.; PEREIRA, J. O; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants.

**Environmental Biotechnology**, v. 3, n.1, p. 40-65, 2000.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROL, G. C.; VAN DER AA, M.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, G. C.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE-BLANCO, C; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic Strains of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, p. 464-477, 2002.

BAKER, R. E. D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The occurrence of latent infections in developing fruits. **Annals of Botany**, London, v. 2, p. 919-931. 1938.

BAO, J. R.; LAZAROVITS, G. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium* wilt control. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. 449-456, 2001.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHABELL, D. K., WELLS, C. R. *In vitro* antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379-382, 1982.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: **Manual de Fitopatologia**. Bergamin FILHO, A.; AMORIM, L. e KIMATI, H. (Eds.) 3ª ed. São Paulo, Ceres, 1995. 919p.

BILLS, G.; DOMBROWSKY, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes**, v. 2, p. 165-194, 2002.

BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. Curitiba, 2000. 58p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná.

BITTENCOURT, J. V. M. Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Maytenus ilicifolia* por Meio de Marcadores RAPD. **Scientia Agrária**, v. 2, p.1-2, 2001.

BLANCO, C. G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Piracicaba, 1999. Tese de Doutorado- escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

BOSSALIS, M. C. Hyperparasitism. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 363-375, 1964.

BRAYFORD, D. Vegetative incompatibility in *Phomopsis* from elm. **Mycological Research**, v. 94. n. 6, p. 745-752, 1990.

BODDY, L.; GRIFFITH, G. S. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. **Sydowia**, v. 41, p. 41-73, 1989.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H.; HYDE, K. D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 943-948, 2001.

CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n.1, p. 85-89, 2002.

CARDOSO-FILHO, J. L.; **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acil-benzolar – S- metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)** Piracicaba, 2003. 125f. Dissertação (Doutorado) – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E.; Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

CARROLL, G. C. The Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEAVEL, J. Van Der (Eds.). *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1986. p. 205-222.

CASTLEBURY, L.A., MENGISTU, A. Phylogenetic distinction of *Diaporthe/Phomopsis* isolates from soybeans [resumo]. **Systematic Mycology and Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 13. 2006.

CENARGEN. **Banco de Dados on Line**. Disponível em: <<http://icewall2.cenargen.embrapa.br:84/micweb/michtml/fgbd01.asp#P>> Acesso em Maio de 2005.

CERVI, A. C.; PACIORNIK, E. F.; VIEIRA, R. F.; MARQUES, L. C. Espécies vegetais de um remanescente de Floresta de Araucária (Curitiba-Brasil): estudo preliminar I. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v.18, n.1-4, p.73-114, 1989.

CHAREPRASERT S.; PIAPUKIEW J.; THIENHIRUN S.; WHALLEY A. J. S.; SIHANONTH P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 481-486, 2006.

CHRISTO, D. **Variabilidade Genética e Diferenciação Molecular de Isolados Endofíticos e Patogênicos de *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp.** Curitiba, 2002.

78 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná.

CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia (Berlin)**, Berlin, v.73, p. 358-362, 1987.

CLAY, K. Fungi and the food of the goods. **Nature**, v. 427, p. 401-402, 2004.

COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley, 1958, 524p.

COCKRUM, P. A.; PETERSON, D. S.; EDGAR, J. A. 1994. Identification of novel *Phomopsis* in Lupin seed extracts. In **Plant-associated toxins. Agricultural, phytochemical and ecological aspects**, DORLING, P. R. p. 232-237. Wallingford: CAB International.

COELHO, A.G. **Software Bood**. v. 3. 04, 2005.

COIMBRA, R.; SILVA, E D. Notas de Fitoterapia. 2ª ed. **Laboratório Clínico Silva Araújo S/A**. 1958.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira Santa"). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 10, p. 523-526, 1999.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal Basic Microbiol**, v.44, p.157-160, 2004.

CORRÊA, R.M.S. **Caracterização de *Phomopsis* e *Phoma* obtidos de sementes de espécies florestais**. 1995. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. ***Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucalyptorum*, two new species from eucalyptus leaves in Brazil**. *Mycological Research*, Cambridge, v.97, p. 582-584, 1993.

CRUZ, G.L. Livro Verde. Vol.II. 1a **Editora Belo Horizonte-Minas Gerais**. 1965.

DALZOTO, P. R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. RAPD analyses of recombination process in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v. 107, p. 1069-1074, 2003.

DJAQUIDA, R.; SORBO, G. D.; REGGIO, C.; ZOINA, A.; FIRRAO, G. Polymorphisms in nuclear rDNA and mtDNA reveal the polyphyletic nature of isolates of *Phomopsis*

pathogenic to sunflower and a tight monophyletic clade of defined geographic origin. **Mycologia**, v. 108, n. 4, p. 393-402, 2004.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 41-49, 2005.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phitopathology**, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971.

EMBRAPA. **Fungos Endofíticos, Introdução.** Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/introducao.htm1>> Acesso em Maio de 2005.

ERNEST, M.; MENDGEN, W. K.; WIRSEL, W. Endophytic Fungal Mutualists: Seed-Borne *Stagonospora* spp. Enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 7, p. 580-587, 2003.

ESPÓSITO, E; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: **Edusc**, 510p, 2004.

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

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effects of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, St. Paul, v.165, p.913-922, 2003.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, p. 785-793, 2004.

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

FELSENTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 366-369, 1985.

FERNANDEZ, F. A.; HANLIN, R. T. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. **Mycologia**, v. 88, n. 3, p. 425-440, 1996.

FERREIRA, M. E. Aplicação de Marcadores Moleculares no Mapeamento Genético de Plantas. In: **III Curso de Marcadores Moleculares**, EMBRAPA/CENARGEN – Brasília, DF, 1994.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows: Versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: SSP/SIB, 2000. p. 255-268. VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press/Constock Pub-lish, 1994. 476 p.

FERREIRA, M.P.; OLIVEIRA, C.N.; OLIVEIRA, B.A.; LOPES, M.J.; ALZAMORA, F.; VIEIRA, M.A.R. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. **Planta**, v. 219, p. 319-324, 2004.

FIALHO, M. B. **Efeito *in vitro* *Sacharomyces cerevicea* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. Piracicaba, 2004. 60f. Dissertação de Mestrado – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FIGUEIREDO, J. G. **Bioprospecção, Caracterização Morfológica e Molecular de Endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com Ênfase EM *Pestalotiopsis* spp.** Curitiba, 2006. Dissertação de Mestrado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* - A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-173, 2004.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 23-43, 2004.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**, Jaguarariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap.8, p.205-227.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.14, p.12-16, 2000.

GAMBOA-GAITÁN, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Endophytic *Phomopsis* Strains from of *Guarea guidonia* (Meliaceae). **Journal of Science**, v. 41, n. 2, p. 215-224, 2005.

GAO, X.; ZHOU, H.; XU, D.; YU, C.; CHEN, Y.; QU, L. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth



revealed y cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 255-266, 2005.

GLIENKE, C.; CHRISTO, D, MACCHERONI JR, W, AZEVEDO, J. L. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the Citrus Black Spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Submetido. 2007.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995. Dissertação de Mestrado- Setor de Ciências Biológicas, Universidade federal do Paraná.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J.L. Genetics variabilityb in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 251-255, 2002.

GÓES, A. **Etiologia, aspectos epidemiológicos e controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta do citros**. 100 p. Relatório técnico. 2005.

GONZALEZ, M.; LOMBARDO, A.; VALLARINO, A. J. Plantas de la medicina vulgar del Uruguay. Uruguay: **Talleres Gráficos**, Cerrito. 149 p. 1937.

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers: a systems for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 832-835, 1992.

GURGEL, L.M.S.; MENEZES, M.; COELHO, R.S.B. Caracterização patogênica, fisiológica e isoenzimática de *Phomopsis anacardii* e *Phomopsis mangiferae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30, 1997, Poços de Caldas. **Resumos....** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1997. p. 269.

GURGEL, L.M.S.; MENEZES, M.; COÊLHO, R.S.B. Estudo comparativo de isolados de *Phomopsis anacardii* e *Phomopsis mangiferae* através da patogenicidade e nutrição de C e N, em três regimes de luminosidade. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 160-166, 2002.

GRAJAL-MARTIN, M. J.; SIMON, C. J.; MUEHLBAUER, F. J. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum f.sp. pisi*. **Phytopatology**, v. 83, p. 612-14, 1993.

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

- GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**, 2ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.
- HALL, T. A. **BioEdit4.8**. Raileigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windons 95/98/NT.
- HANLIN, R. T.; MENEZES, M. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE. Recife-PE. 1996. 274p.
- HERBERT, J. A.; GRECH, N.M. **A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa**. Plant Disease, St. Paul, v. 69, p. 1007, 1985.
- HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.31, n.47, p.163-167, 2001.
- IBRAHIM, G.; BAYCA, B. **Fungal, bacterial and nematological problems of citrus, grape and stone fruits in Arab countries**. Arab Journal of Plant Protection, Beirut, v.7, n.2, p.190-197, 1989.
- ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Triterpenes fom *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3713-3716,1991.
- ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Oligonicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of natural Products**, v. 56, p. 1479-1485,1993.
- JASALAVICH, C.; OSTROFSKY, A.; JELLISON, J. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.11, p. 4725-4734, 2000.
- JOHNSTON, P. R.; FULLERTON, R. A. ***Cryptosporiopsis citri* sp. Nov., cause of a citrus leal spot in the Pacific Islands**. New Zealand Journal of Experimental Agriculture, Wellington, v.16, p.159-163, 1988.
- JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 94, n.1, p. 93-100, 2004.
- KIM, K. H.; TEN, L. N.; LIU, Q. M.; IM, W. T.; LEE, S. T. *Sphingobacterium daejeonense* sp nov., isolated from a compost sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2031-2036, 2006.

KIM, B. Y.; WEON, H. Y.; LEE, K. H.; SEOK, S. J.; KWON, S. W.; GO, S. J.; STACKEBRANDT, E. *Dyella yeojuensis* sp nov., isolated from greenhouse soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2079-2082, 2006.

LEE, Y. H.; SNOW J. P. Phenotypic and genetic variations in *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, the soybean stem canker pathogen. **Phytopathology**, v. 81, p.1205. 1992.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from razilian evera es (*Maytenus ilici olia* and *M. aqui olium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

LEONIAN, L. H. A study of the factors promoting pycnidium – formation in some Sphaeropsidales. **American Journal Botanic**, Columbus, v.11, p. 19-50, 1924.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n. 4, p. 287-294, 1992.

LI, J. Y.; STROBEL, G. A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 261-265, 2001.

LIMA, O. G. de; COELHO, J. S. de B.; WEIGERT, E.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LIMA, D. de A.; SOUZA, M. A. de M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores – Sobre a presença de maitenina e pristimerina na parte cortical das raízes de *Maytenus ilicifolia*, procedente do Brasil Meridional. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, n. 1, p. 35-38, 1971.

LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v.88, p. 277-282, 2001.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, Oxford, v. 151, n. 1, p. 67-73, 2000.

LU, G. Z.; CANNON, P. F.; REID, A.; SIMMONS, C. M. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycological Research**, v. 108, n. 1, p. 53-63, 2004.

MAKI, C. S. **Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de Cacau *Theobroma cacao* L.** Piracicaba, 2006. Dissertação de Doutorado – Setor de Agronomia- Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade, Escola Superior de

Agricultura Luiz de Queiroz.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi from carnation. **Phytopathology**, v.84, p.98-101, 1993.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, v. 55, n.1, p.1-7, 1998.

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

McMILLAN JR., R.T. *Guignardia citricarpa* a cause of black spot on mango foliage in Florida. Journal of **Phytopathology**, Berlin. v.117, p. 260-264, 1986.

McPHERSON, M. J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G. R. PCR 1 **A practical approach**. IRL. New York, v.1, 348p, 1991.

McONIE, K. C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, p. 40-43, 1964a.

McONIE, K. C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, p. 64-67, 1964b.

MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, G.; LINDERS, E. G. A variability for isozyme, vegetative, compatibility, and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycological Research**, v.98, n.3, p.267-276, 1994.

MEIRA PENNA. Dicionário Brasileiro de Plantas Mediciniais. 3ª Ed. **Editores Kosmos**, Rio de Janeiro, 1946.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: **Controle biológico**. v. I. MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. (Eds.) Jaguariúna, SP, Embrapa-CNPMA. 1998. 264p.

MICHELMORE, R. W.; HULBERT, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 383-404, 1987.

MOLLER, C. WEBER, G.; DREYFUSS, M. M. Intraespecific diversity in the fungal species *Chaunopycnis alba*: implications for microbial screening programs. **Journal of industrial microbiology**, v. 17, p. 359-372. 1996.

MONTANARI, T.; CARVALHO, J. E. de; DOLDER, H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart.ex. Reiss on spermatogenesis. **Contraception**, v. 57, p. 335-339,1998.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. On pregnant mice. **Contraception**, v. 65, p. 171-175,2002.

MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; KANG, J.; PHILLIPS, A. J. L. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization **Mycologia**, v. 93, n. 1, p. 146-167, 2001.

MULLIS, K. B.; F. A. FALOONA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURALI, T. S.; SURYNARAYANAN, T. S.; GEETA, R. Endophytic *Phomopsis* species: Host range and implications for diversity estimates. **NRC Research Press**. Canadá. 2006.

NEDASHKOVSKAYA, O. I.; VANCANNEYT, M.; KALINOSKAYA, N. I.; MIKHAILOV, V. V.; SWINGS, J. *Aquimarina intermedia* sp nov., reclassification of *Stanierella latercula* (Lewin 1969) as *Aquimarina latercula* comb. nov and *Gaetbulimicrobium brevivita*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2037-2041, 2006.

NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia**, v.5, n.29, 2002.

O'DONNELL, K.; GRAY, L. E. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 8, p. 709-716. 1995.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 657-663, 1998.

OULLET, T.; SEIFFERT, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD e PCR amplification. **Phytopathology**, v. 83, p. 1003-1007, 1993.

PAAVANEM-HUHTALA, S.; AVIKAINEM, H.; YLI-MATTILA, T. Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. **European Journal Plant Pathological**, Dordrecht, v.106, n.2, p.187-198, 2000.

PANIZZA, S. **Plantas que Curam (Cheiro de Mato)**. 15° ed. São Paulo: IBRASA, 1998. 265 p.

PATEL, B. N.; PATEL, R. C.; TILVA, D. G. *Phyllosticta* leaf spot: a new disease in Bidi

tobacco nurse. **Tobacco Research**, Rajahmundry, v.14, p. 1176-1178, 1988.

PATERSON, R. R. M.; BRIDGE, P. D. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. CAB International, 125 p., 1994.

PARMETER, J. R. An effect of substrate on spore form in *Phomopsis*. **Phytopatholog**, v. 48. p. 396-397. 1958.

PENNA, E. B. da S. **Microrganismos endofíticos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, ST.HIL.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. por RAPD**. Curitiba, 2000. 123 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of arial plant tissues. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J.VAN DEN (Ed). **Microbiology of the Phyllosphere**. **Cambrige University Press**, p. 175-87, 1986.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Sprin er-Verla, 1991. p. 179-197.

PETRINI, O.; STONE, K.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 789-796, 1982.

PHILLIPS, A. J. L. **The plant pathogenic genus *Phomopsis* and its teleomorph (*Diaporthe*): Development and application of morphological, biological and phylogenetic species concepts**. Disponível em: <[http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria\\_site/personal\\_web\\_page.htm](http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/personal_web_page.htm)> Acesso em Dezembro de 2006.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por Meio de Marcadores RAPD e seu Potencial Farmacológico**. Curitiba, 2006. Dissertação de Doutorado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PIOLI, R. N.; MORANDI, E. N.; MARTÍNEZ, M. C.; LUCCA, F.; TOZZINI, BISARO, V.; HOPP, H. E. Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean – Producing Área of Argentina. **Phytopathology**, v. 93, n.2, p.136-146, 2003.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMOS, L.M.; MAC DONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p.141-238, 1953.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). **Fitopatologia Venezolana**, Maracay, v. 3, p. 34-43, 1990.

PROMPUTTHA, I.; JEEWON, R.; LUMYONG, S.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). **Fungal Diversity**, v. 20, p. 167-186, 2005.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 89-96, 2001.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.1, p.17-20, 1985.

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

RIBEIRO, L. A. de **Variabilidade Genética por RAPD em fungos endófitos de Gênero *Penicillium*, provenientes de *Zea mays* L.** Curitiba, 1995. 90 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.

RIEDL, H.; WECHTL, E. Proposal to conserve the name *Phomopsis* (Sacc.) Bubak (1905) against *Myxolibertella* Hohnel (1903). **Taxon**, v. 30, n. 4, p. 826-828, 1981.

ROBES, C. F. **A mancha preta dos fungos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista.** Laranja. Cordeirópolis, v. 11, p. 75-86, 1990.

ROBES, C. F. BITTENCUCOURT, S. M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico – CTAA-EMBRAPA**, n. 19, p. 1-5, 1995.

RODRIGUES, K. F.; SAMULES, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* in Brazil: a preliminary study. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, p. 131 – 135. 1999.

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

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

RODRIGUES, K. F.; SIEBER, T. N.; GRÜNIG, R. C.; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological**

**Research**, Cambridge, v. 108, p. 45-52, 2004.

RODRIGUES, K. F.; COSTA, G. L. CARVALHO, M. P.; EPIFANIO, R. A. Evaluation of extracts produced by some tropical fungi as potential cholinesterase inhibitors. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.1617-1621, 2005.

RODRIGUES, M. B. C. **Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros**. Piracicaba, 2006. 67 p. Dissertação de Mestrado – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, Exeter Publishing, 1988.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA A. W. V.; MAKI, C. S., ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 24-33, 2005.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p.1350-1354, 1985.

SAMPAIO, J. P.; FELL, J. W.; GADANHO, M.; BAUER, R. *Kurtzmanomyces insolitus* sp nov., a new anamorphic heterobasidiomycetous yeast species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, p. 619-625, 1999.

SAMUELES, G. J.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 37-67, 1995.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, M.F. **Análise da micoflora associada ao baru (*Dipteryx alata* Vog.) e a caroba (*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.)**. Brasília/DF, 1996. Dissertação de Mestrado. Universidade Nacional de Brasília.

SATOKO K.; MINAKA, N.; KOBAYASHI, T.; KUDO, A.; OHTSU, Y. Molecular Phylogenetic Analysis of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions and Comparison of Fertility in *Phomopsis* Isolates from Fruit Trees. **Plant Pathology**, v. 66, p. 191-210, 2000.



SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S. RÖMMERT, A. KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 996-1004. 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELENA, C.; SALATI F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, p. 1185-1195. 2006.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; ITAKA, Y. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1675-1681, 1994.

SHIVAS, R. G.; ALLEN, J. G.; WILLIAMSON, P. M. Intraspecific variation demonstrated in *Phomopsis leptostromiformis* using cultural and biochemical techniques. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 320-323, 1991.

SHRESTHA, K.; STROBEL, G. A.; PRAKASH, S.; GEWALI, M. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of *Himalayan yew* of Nepal. **Planta Medicinal**, v. 67, p. 374-376, 2001.

SILVA, C. G.; RECIO, R. A.; OLIVEIRA, A. B. de; PAIVA, R. L. R. Coleta e avaliação da qualidade fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* M. (espinheira-santa). **Tribuna Farmacêutica**, v. 57/59, p. 46-50, 1991.

SILVA, F. A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE. 6. **Anais Cancun: American Society of Agricultural Engineers**, p. 294-298, 1996

SILVA, F. de A. S. AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A. R. New Bioactive Metabolites Produced by *Phomopsis cassiae*, an Endophytic Fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal Brasileiro Chemical Society**, v.16, n.6, p. 1463-1466, 2005.

SILVA, R. L. DE O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v.

20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SILVEIRA, E.B. 2001. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. Pp. 71-100. In: R. Barros e S.J. Michereff. Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife, **Imprensa Universitária da UFRPE**.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Editores da Universidade/UFRGS**, 174p, 1986.

SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs**. J. Cramer., Germany. 701p. 1984.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. W. H. Freeman; Co: San Francisco. 1973.

SOUZA FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; DA SILVA FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; SPARTACO, A. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, Manaus, 2004.

SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology**, p. 103-108, 2008.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência Tecnológica de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

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

STINSON, M.; ERZA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. Of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, St. Paul, v.165, p. 913-922, 2003.

STROBEL, A. G. Rainforest Endophytes and Bioactive Products. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUGHA, S.K.; SINGH, B.M.; SHARMA, B.M. Studies on *Phyllosticta glumarum* causing glume blight of rice (*Oryza sativa* L.) Himachal. **Journal of Agricultural Research**, Palampur, v. 12, n. 1, p. 11-14, 1986.

TAYLOR-ROSA, S. G.; BARROS, I. B. **Caracterização das sementes de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss, espinheira - santa e viabilidade de sua propagação sexuada.** Porto Alegre, 1994.106f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680. 1994.

TIMNICK, M.B.; LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. Factors affecting sporulation of *Diaporthe phaseolorum* var. *bataatatis* from soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 41, n. 4, p. 327-336, 1951.

UECKER, F. A. **A World list of Phomopsis names with notes on nomenclature, morphology and biology.** National Fungus Collection, v. 13, 1988.

VAN DER AA, H. A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, n. 5, 1973.

VAN DER AA, H. A., M. E. Noordeloos, and J. de Gruyter. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. **Studies in Mycology**, v. 32, p. 3-19. 1990.

VASCONCELOS, M.J.V.; ALMEIDA, M.A.; HENNING, A.M.R.; BARROS, A.A.; MOREIRA, E.G.; Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 520-523, 1994.

VELICHETI, R. K.; McCCLARY, C.; LAMISON, R. D.; SINCLAIR, J. B. Immunodetection of the *Diaporthe* and *Phomopsis* complex of soybeans. **Phytopathology**, v. 81, p. 1212, 1991.

VIDIC, M. Variability in *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* on soybean in the Vojvodina Province in Serbia. **Zastita Bilja**, v. 42, p. 183-189, 1991.

VILARINHOS, A. D.; PAULA JR, T. J. BARROS, E. G.; MOUREIRA, M. A. Characterization of races of *Colletotrichum lindemutianum* by the random amplified polymorphic DNA technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.194-198, 1995.

VILLA- CARVAJAL, M.; COQUE, J. J. R.; ALVARÉZ-RODRIGUÉZ, M. L.; URUBURU, F.; BELLOCH, C. Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 745-750, 2004.

VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*). **Mycological Research**, v. 98, p. 423-432, 1994.

WAGENAAR, M.; CORWIN, J.; STROBEL, G. A.; CLARDY, J. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoctadiella*. **Journal Natural Products**, v. 63, p.1692-1695, 2000.

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. Atheneu. São Paulo, 1999. 334p.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, p. 249-253, 2000.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOSWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2 ed. New York: Freeman and Company. 1992.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WHITE Jr, J.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte to *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, Lawrence, v. 78, n. 5, p. 846-850, 1989.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, Lawrence, v. 82, p. 218-226, 1990.

WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A.C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agriculture Ecosystem & Environment**, v. 44, p.13-37, 1993.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGER, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 218, p. 704-740, 1993.

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

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y., TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.

ZOU, W. X.; TAN, R. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p. 448-459, 2001.

## ANEXOS

ANEXO 1 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS DE *Phomopsis* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

### EXPERIMENTO FATORIAL

<b>ANOVA</b>				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFITICOS	50	496.671024	9.933420	94.396**
MEIOS DE CULTURA	2	137.912854	68.956427	655.287**
INTERAÇÃO A	100	193.198257	1.931983	18.359**
INTERAÇÃO b	100	10.989107	0.109891	1.044**
RESÍDUO	206	21.677560	0.105231	
Total	458	860.448802		

INTERAÇÃO A : INTERAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE CULTURA E OS ISOLADOS de *Phomopsis*.

INTERAÇÃO B : INTERAÇÃO ENTRE AS REPETIÇÕES DOS ISOLADOS DE *Phomopsis*.

\*\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ )

<b>TESTE DAS MÉDIAS</b>	
MÉDIAS ENTRE OS MEIOS DE CULTURA	
BDA	5.169935 a
MEA	4.973856 b
AV	3.921569 c

CV% = 6.2

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 2- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS DE *Phomopsis* EM MEIO BDA

EXPERIMENTO FATORIAL

<b>ANOVA</b>				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	50	230.248366	4.604967	43.761**
RESÍDUO	206	21.677560	0.105231	
Total	458	860.448802		

\*\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ )

**TESTE DAS MÉDIAS**

ESBA1	7,00	a
A323	7,00	a
A215A	7,00	a
ESSD1	7,00	a
SM9713	7,00	a
ESGF1	7,00	a
SM9631	7,00	a
ESJD1	7,00	a
ESKD1	6,67	a
A334	6,67	a
ESDF1	6,33	b
A132	6,33	b
A123	6,00	b
A333A	6,00	b
MU0123	6,00	b
ESJH1	6,00	b
A321	6,00	b
ESRD1	6,00	b
A116	6,00	b
A134	5,67	b
A115B	5,67	b
ESIA1	5,33	c

**TESTE DAS MÉDIAS (CONTINUAÇÃO)**

A131	5,00	c
SM9714	5,00	c
A135	5,00	c
ESIE1	5,00	c
ESFB2	5,00	c
A124	5,00	c
ESPAC22	5,00	c
ES2KF1	5,00	c
A113	5,00	c
ESJE1	5,00	c
ESJE2	4,33	d
ESFH1	4,00	d
ESJG1	4,00	d
ES2WC1	4,00	d
PHO1	4,00	d
SM9638	4,00	d
ES2NA1	4,00	d
ES2AB1	4,00	d
ESFF1	4,00	d
AT9811	4,00	d
AT9810	4,00	d
ES2WF1	4,00	d
A126	4,00	d
PHO19	4,00	d
A216B	4,00	d
ES80J	3,67	d
ESGA1	3,67	d
AT9906	3,00	e
A333B	2,33	f

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



ANEXO 3– ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS DE *Phomopsis* EM MEIO AVEIA

EXPERIMENTO FATORIAL

<b>ANOVA</b>				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	50	189.058824	3.781176	35.932 **
RESÍDUO	206	21.677560	0.105231	
Total	458	860.448802		

\*\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ )

**TESTE DAS MÉDIAS**

ESKD1	7,00	a
ESJE2	6,00	b
A123	6,00	b
ESJE1	5,33	c
SM9638	5,00	c
AT9811	5,00	c
SM9713	5,00	c
PHO1	5,00	c
ESBA1	5,00	c
SM9631	5,00	c
ESFB2	5,00	c
A334	5,00	c
A323	5,00	c
MU0123	5,00	c
A333A	4,33	d
ESJD1	4,33	d
ESGF1	4,33	d
A116	4,33	d
PAC22	4,00	e
ESDF1	4,00	e
A321	4,00	e
A132	4,00	e
ES2KF1	4,00	e

**TESTE DAS MÉDIAS (CONTINUAÇÃO)**

ESJG1	4,00	e
ESRD1	4,00	e
PHO19	4,00	e
A115B	4,00	e
A124	4,00	e
ESFF1	3,67	e
A134	3,67	e
ESIE1	3,67	e
A135	3,67	e
A131	3,67	e
A113	3,67	e
ES2WF1	3,67	e
SD1	3,67	e
ESIA1	3,33	e
ESGA1	3,00	f
ESJH1	3,00	f
ESFH1	3,00	f
AT9906	3,00	f
ES2NA1	3,00	f
A216B	3,00	f
ES80J	3,00	f
ESA215A	2,67	f
AT9810	2,00	g
A333B	2,00	g
ES2AB1	2,00	g
SM9714	2,00	g
ES2WC1	2,00	g

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 4– ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS DE *Phomopsis* EM MEIO MEA

EXPERIMENTO FATORIAL

<b>ANOVA</b>				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	50	270.562092	5.411242	51.423**
RESÍDUO	206	21.677560	0.105231	
Total	458	860.448802		

\*\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ )

**TESTE DAS MÉDIAS**

A323	7,33	a
SM9631	7,00	a
ESKD1	7,00	a
A134	7,00	a
ESIE1	7,00	a
A116	6,67	b
A334	6,67	b
A215A	6,33	b
ESSD1	6,33	b
A321	6,00	c
MU0123	6,00	c
ESGF1	6,00	c
ESRD1	6,00	c
AT9811	6,00	c
SM9713	6,00	c
A123	6,00	c
ESJH1	6,00	c
ESDF1	6,00	c
A131	5,67	c
IA1	5,67	c
ESBA1	5,67	c
ESJD1	5,67	c
A333A	5,33	d
A135	5,00	d

**TESTE DAS MÉDIAS (CONTINUAÇÃO)**

ES2NA1	5,00	d
A124	5,00	d
A132	5,00	d
SM9714	5,00	d
ESFB2	5,00	d
A115B	4,67	e
ES2AB1	4,33	e
A216B	4,33	e
A113	4,33	e
PHO1	4,00	f
SM9638	4,00	f
ES2WF1	4,00	f
A126	4,00	f
ESJE1	4,00	f
ESPAC22	4,00	f
ESFF1	4,00	f
ES2KF1	4,00	f
ESJG1	3,67	f
ES80J	3,67	f
ESJE2	3,33	g
ESFH1	3,33	g
AT9906	3,00	g
ESGA1	3,00	g
SM9810	3,00	g
ES2WC1	3,00	g
A333B	2,33	h
PHO19	2,33	h

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 5 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS ESPOROS BETACONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Phomopsis* spp EM MEIO BDA

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

**ANOVA**

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	46	16021.92500	340.89202	161.7590 **
RESÍDUO	432	910.40000	2.10741	
Total	478	16932.32500		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

**TESTE DAS MÉDIAS**

MÉDIAS DO COMPRIMENTO

AT9906	35,2	a
AT9810	35,3	a
ESFH1	29,7	b
ESPAC22	19,5	c
ES2KF1	19,4	c
SM9631	19,3	c
ESGA1	18,4	cd
PHO19	18,4	cd
ES80J	16,6	de
ESRD1	15,2	ef
ESFB2	14,3	efg
ESJE2	14,2	efg
ESJE1	14,2	efg
ESJG1	13,1	fgh
A323	12,7	fghi
A333A	12,6	ghij
A135	12,3	ghij
A124	12,3	ghij
A126	12,3	ghij
A132	12,3	ghij
A131	12,3	ghij
A134	12,3	ghij

**TESTE DAS MÉDIAS (CONTINUAÇÃO)**

A115B	12,3	ghij
ESIE1	12,3	ghij
ES2WC1	11,9	ghil
ES2WF1	11,9	ghil
SM9713	11,6	hil
A334	11,6	hil
ESIA1	11,5	hil
A333B	11,3	hil
ESFF1	11,3	hil
ESGF1	11,1	hil
ES2AB1	10,7	him
A123	10,7	him
A113	10,7	him
ESJD1	10,6	him
ESKD1	10,5	im
ES2NA1	10,4	im
A215A	10,3	im
SM9714	10,2	im
ESSD1	10,1	m
ESJH1	9,7	m
MU0123	9,6	m
A321	9,6	m
ESDF1	9,5	m
A216B	9,5	m
A116	8,5	m

DMS = 2.59444  
CV% = 10.52904

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 6 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	21	26.74219	1.27344	45.9861 **
RESÍDUO	88	2.43688	0.02769	
Total	109	29.17907		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS  
MÉDIAS DAS INTERAÇÕES

FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	2,93	a
Fungicida Derosal	2,36	b
ESGF1	1,57	c
ESGA1	1,37	cde
ESFH1	1,34	cdef
ESIA1	1,20	cdefg
ES2KF1	1,19	cdefgh
ESFF1	1,46	cdefgh
ES2NA1	1,11	defgh
ES2AB1	1,10	defgh
ESKD1	1,14	defgh
ESJE2	1,10	defgh
ESBA1	1,12	defgh
ESRD1	0,98	efgh
ESJG1	0,99	efgh
ESJE1	0,99	efgh
ESFB2	0,96	fgh
ESJH1	0,94	gh
ESJD1	0,93	gh
ESIE1	0,95	gh
ESSD1	0,78	h
ESDF1	0,78	h

DMS = 0.39023

CV% = 13.40825

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 7 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

<b>ANOVA</b>				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	9	9.74154	1.08239	22.5325 **
RESÍDUO	40	1.92148	0.04804	
Total	49	11.66302		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

<b>TESTE DAS MÉDIAS</b>		
MÉDIAS DAS INTERAÇÕES		
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	2,01	a
fungicida	1,74	ab
AT9906	1,39	bc
AT9810	1,17	cd
AT9811	1,02	cde
SM9638	1,10	cde
SM9714	0,76	de
SM9631	0,75	de
MU0123	0,67	e
SM9713	0,65	e

DMS = 0.46460  
CV% = 19.46824

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



ANEXO 8 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	22	23.82133	1.08279	23.9352 **
RESÍDUO	92	4.16192	0.04524	
Total	114	27.98325		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES

FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	2,44	a
ES2WC1	2,37	a
fungicida	1,85	b
ES80J	1,38	bc
A333B	1,36	cd
ES2WF1	1,17	cde
A333A	1,13	cde
A132	1,10	cde
A215A	1,06	cde
A116	1,02	cde
A124	1,01	cde
A115B	1,01	cde
A135	1,00	cde
A215B	0,97	cde
A321	0,94	cde
A334	0,93	cde
A323	0,92	cde
A123	0,91	cde
A113	0,91	cde
A126	0,89	de
A131	0,88	e
ESPAC22	0,85	e
A134	0,76	e

DMS = 0.50157  
CV% = 18.09416

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 9 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC33/05

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

<b>ANOVA</b>				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	50	62.10037	1.24201	16.5056 **
RESÍDUO	204	15.35052	0.07525	
Total	254	77.45089		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

**TESTE DAS MÉDIAS**

<b>MÉDIAS DAS INTERAÇÕES</b>		
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC33/05	3,02	a
FUNGICIDA Derosal	2,44	abc
ES2WC1	2,77	ab
AT9906	2,24	bcd
AT9810	2,22	bcde
SM9638	2,18	bcdef
ESGF1	2,01	cdefg
A333B	1,88	cdefgh
A132	1,67	defghi
SM9714	1,59	defghij
ESFF1	1,53	efghil
ES2WF1	1,50	fghil
ESGA1	1,49	fghil
ESFH1	1,47	ghil
ES80J	1,47	ghil
MU0123	1,44	ghil
ES2NA1	1,43	ghil
AT9713	1,42	ghim
A321	1,41	ghim
A216B	1,40	ghim
AT9811	1,39	ghim
A116	1,37	ghim

**TESTE DAS MÉDIAS (CONTINUAÇÃO)**

ESBA1	1,34	ghim
ES2AB1	1,33	ghim
A323	1,32	ghin
ESJG1	1,31	ghin
ESIE1	1,30	hin
A333A	1,29	hin
A113	1,27	hin
A134	1,25	hin
ESSD1	1,22	hin
ESKD1	1,21	hin
ESIA1	1,17	in
A124	1,13	in
A334	1,12	in
ES2KF1	1,12	in
ESJE1	1,10	in
ESPAC22	1,08	in
A131	1,08	in
A126	1,06	in
A135	1,02	in
ESRD1	0,94	n
SM9631	0,93	n
ESJE2	0,90	n
ESJH1	0,90	n
ESFB2	0,88	n
ESJD1	0,87	n
A123	0,87	n
ESDF1	0,86	n
A115B	0,72	n
A215A	0,62	n

DMS = 0.70465  
CV% = 19.83267

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 10 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC33/05 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

<b>ANOVA</b>				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	28	21.45366	0.76620	40.7144 **
RESÍDUO	116	2.18300	0.01882	
Total	144	23.63666		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

**TESTE DAS MÉDIAS**

<b>MÉDIAS DAS INTERAÇÕES</b>		
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC33/05	2,22	a
ESRD1	1,9	b
A131	1,76	b
ESIA1	1,78	b
SM9713	1,62	bc
ESJD1	1,62	bc
A126	1,54	bcd
MU0123	1,49	bcde
A333A	1,34	cdef
ESGA1	1,34	cdef
A113	1,33	cdef
ESGF1	1,30	cdef
A334	1,30	cdef
ESBA1	1,40	cdef
SM9638	1,27	def
ESJH1	1,19	efg
ESDF1	1,15	fgh
ESSD1	1,12	fgh
ESKD1	1,13	fgh
ES2AB1	1,11	fghi
A124	1,11	fghi

**TESTE DAS MÉDIAS (CONTINUAÇÃO)**

---

A215A	1,09	fghi
A321	1,08	fghi
A134	0,89	ghij
A115B	0,82	hij
ESFF1	0,78	ij
ESFH1	0,71	l
A123	0,62	l
ES2WF1	0,42	l

---

DMS = 0.33193  
CV% = 10.95343

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 11 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Phomopsis* CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

**ANOVA**

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	28	112.64938	4.02319	48.1124 **
RESÍDUO	116	9.70000	0.08362	
Total	144	122.34938		

**TESTE DAS MÉDIAS**

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES		
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	4,22	a
ESGA1	2,75	b
ESGF1	2,67	bc
ESBA1	2,65	bc
SM9713	2,61	bc
A333A	2,51	bcd
ESSD1	2,35	bcde
MU0123	2,34	bcde
ESKD1	2,11	bcdef
A215A	2,03	cdef
A321	1,88	defg
A131	1,73	efgh
SM9638	1,67	efgh
A124	1,48	fghi
ESJD1	1,47	fghi
A113	1,30	ghij
ESIA1	1,22	ghij
ES2AB1	1,28	ghij
ESDF1	1,24	ghij
A334	1,12	hij
A115B	1,06	hij

**TESTE DAS MÉDIAS (CONTINUAÇÃO)**

ESRD1	1,04	hij
ES2WF1	0,86	il
A134	0,83	il
A126	0,80	il
ESFF1	0,75	l
A123	0,65	l
ESFH1	0,25	l
ESJH1	0,17	l

DMS = 0.69970  
CV% = 11.93907

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 12 – MATRIZ DE DADOS PARA CARACTERIZAÇÃO

1	CRITÉRIOS	MEIOS DE CULTURA	MEDIDAS
1	AV	MUJ0123	1
2	MEA	SM9631	0
3	BDA	SM9638	1
4	AV	SM9713	0
5	MEA	SM9714	0
6	BDA	AT9810	1
7	AV	AT9811	1
8	MEA	AT9906	1
9	BDA	ES2AB1	1
10	AV	ES2KF1	1
11	MEA	ES2NA1	1
12	BDA	ES2W.C.1	1
13	AV	ES2W.F.1	1
14	MEA	ES80J	0
	BDA	ESBA1	1
	AV	ESDF1	1
	MEA	ESFB2	1
	BDA	ESFF1	1
	AV	ESFH1	1
	MEA	ESGA1	1
	BDA	ESGF1	1
	AV	ESIA1	0
	MEA	ESIE1	1
	BDA	ESJD1	0
	AV	ESJE1	1
	MEA	ESJE2	0









		BDA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
23	35,2 a 35,3µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	29,7 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	19,5 a 19,3 µM	BDA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18,4 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	16,6 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15,2 µM	BDA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	14,3 a 14,2 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	13,1 µM	BDA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12,7 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12,6 a 12,3 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
	11,9 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11,6 a 11,1 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	10,7 a 10,6 µM	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10,5 a 10,2µM	BDA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	9,7 a 8,5µM	BDA	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
24	7,33 a 7,00cm	MEA	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	6,77 a 6,33 cm	MEA	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	6,00 a 5,67 cm	MEA	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5,33 a 5,00cm	MEA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
	4,67 a 4,33cm	MEA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	4,00 a 3,67cm	MEA	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	3,33 a 3,00cm	MEA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,33cm	MEA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	7,00 a 6,67cm	BDA	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	6,33 a 5,67cm	BDA	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
	5,33 a 5,00cm	BDA	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	4,33 a 3,67cm	BDA	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	3,00cm	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,33cm	BDA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	7,00cm	AV	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6,00cm	AV	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5,33 a 5,00cm	AV	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	4,33cm	AV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	4,00 a 3,33cm	AV	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
	3,00 a 2,67cm	AV	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	2,00cm	AV	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Nota: \* - Característica avaliada nos três meios. As características foram avaliadas seguindo os seguintes critérios:

1. Bordos da colônia: regular (1) ou irregular (0)
2. Micélio denso
3. Micélio ralo
4. Micélio granuloso aéreo
5. Micélio algodonoso
6. Coloração do micélio: Branco
7. Coloração do micélio: Marrom
8. Coloração do micélio: Cinza
9. Coloração do micélio: Verde
10. Coloração do micélio: Amarelo
11. Coloração do micélio: Bege
12. Coloração do micélio: Preto
13. Coloração do reverso da placa de Petri: Branco
14. Coloração do reverso da placa de Petri: Marrom
15. Coloração do reverso da placa de Petri: Preto
16. Coloração do reverso da placa de Petri: Cinza
17. Coloração do reverso da placa de Petri: Verde
18. Coloração do reverso da placa de Petri: Amarelo
19. Coloração do reverso da placa de Petri: Bege
20. Esporulação: com esporulação (1) sem esporulação (0)
21. Conídio do tipo: alfa
22. Conídio do tipo: beta
23. Comprimento dos conídios do tipo beta
24. Diâmetro médio do crescimento das colônias

