

JOSIANE APARECIDA GOMES FIGUEIREDO

**BIOPROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
MOLECULAR DE ENDÓFITOS DE *Maytenus ilicifolia*, COM ÊNFASE
EM *Pestalotiopsis* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre, área de Concentração: Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Chirlei Glienke

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Ida Chapaval Pimentel.

CURITIBA

2006

JOSIANE APARECIDA GOMES FIGUEIREDO

**BIOPOSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
MOLECULAR DE ENDÓFITOS DE *Maytenus ilicifolia*, COM ÊNFASE
EM *Pestalotiopsis* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre, área de Concentração: Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Chirlei Glienke

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ida Chapaval Pimentel.

CURITIBA

2006

*“Se minha rocha de refúgio, a casa
fortificada, onde eu possa salvar-me,
porque tu és minha rocha e
fortaleza”.*

Sl 31, 3-4

DEDICO

*A você que sempre confiou em
mim, nunca me deixou desistir de
lutar e acreditar que meu sonho
se realizaria...*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e especiais agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho:

À Prof^ª Dr^a Chirlei Glienke, por contribuir para realização do meu sonho, tornou-se uma amiga e um exemplo, meus agradecimentos vão muito além da sua orientação e seria impossível expressá-los apenas com palavras em uma folha de papel.

À Prof^ª Dr^a Ida Chapaval Pimentel, que sempre esteve disponível contribuindo para o meu engrandecimento com seus conhecimentos, orientando e aconselhando, indo além da co-orientação, tornando-se uma amiga.

Às Prof^{as} Dr^{as} Lygia Vitória Galli-Terasawa, Vanessa Kava Cordeiro e Patrícia Dalzoto pela convivência, sugestões e auxílio no LabGeM;

À Prof^ª Dr^a Sônia Alvim Veiga Pileggi que ensinou e auxiliou nas rotinas do laboratório e cedeu isolados endofíticos de espinheira santa;

Aos Professores do Mestrado em Microbiologia, que contribuíram para minha formação;

À Prof^a. Dr^a. Vânia Aparecida Vicente e a aluna de iniciação científica Isadora, pelo auxílio no seqüenciamento dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis*;

Ao Professor Juarez Gabardo, pelo auxílio com a parte estatística deste trabalho e pelo incentivo;

À Prof^ª Dr^a Thelma pela utilização do Laboratório de Micologia e auxílio na microscopia;

Ao Prof^o Dr^o José Odair Pereira e a MsC Antonia Souza da Universidade Federal do Amazonas, pelas linhagens de *Pestalotiopsis* utilizadas neste trabalho;

À Profª Drª Maria Luiza Petzel-Erler, do Laboratório de Genética Molecular Humana e aos estagiários, por algumas facilidades concedidas neste trabalho;

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Profª Drª Vanete Tomaz Soccol, pelo incentivo;

Ao Departamento de Genética e ao Laboratório de Microbiologia do Departamento Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná por permitir o uso de suas instalações;

Aos amigos do mestrado pelos momentos de convivência dentro e fora da Universidade;

À aluna de iniciação científica Juliana Fabris, amiga sincera e companheira de muitos momentos;

Aos alunos de Pós-graduação do LabGeM, Danyelle, André, Renata e Tatiane pela amizade e cooperação no trabalho diário dentro do laboratório;

Aos estagiários do LabGeM por bons momentos de convivência e ajuda naqueles momentos que tudo parecia impossível de ser realizado, em especial à Rosana, ao Lucinir e ao Hugo;

À amiga Izolde Gaetner, pela ajuda e disponibilidade;

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

À Shirley Rolim Cercal, pelo auxílio técnico com o material de laboratório;

À Arlete Nitsche, secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelas orientações e informações;

À EMBRAPA, de Colombo, PR, pela disponibilidade da coleta de folhas de plantas de espinheira santa;

Aos funcionários dos Laboratórios de Bacteriologia e Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR, pelos microrganismos testes de referência utilizados neste trabalho;

A minha família, em especial à minha mãe, minha irmã e ao meu cunhado, pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos;

Ao casal de amigos Andréia e Marins, por serem pessoas maravilhosas, com as quais eu tenho o privilégio de conviver;

Às amigas Cinara e Lauriani, pelo carinho e compreensão da minha ausência neste período;

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1 Microrganismos endofíticos.....	04
3.2 Fungos endofíticos de plantas medicinais.....	09
3.3 Espinheira santa (<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex. Reiss).....	10
3.3.1 Considerações Gerais.....	10
3.3.2 Características morfológicas.....	11
3.3.3 Componentes químicos e propriedades terapêuticas.....	11
3.4 Mancha preta do citros e <i>Guignardia citricarpa</i> Kiely.....	13
3.5 Antagonismo entre microrganismos.....	16
3.6 Controle biológico.....	18
3.7 Substâncias antimicrobianas produzidas por fungos endofíticos.....	20
3.8 <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	22
3.8.1 Taxonomia de <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	25
3.9 Marcadores moleculares do tipo RAPD.....	27
3.9.1 RAPD em microrganismos endofíticos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Material biológico.....	30
4.1.1 Fungos endofíticos de espinheira santa.....	30
4.1.2 Microrganismos usados para teste de antagonismo e atividade antimicrobiana ...	30
4.1.3 Fungos endofíticos utilizados para análise de variabilidade genética.....	31
4.2 Meios e soluções.....	32
4.2.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA).....	32
4.2.2 Meio Ágar-Dextrose-Folha de espinheira santa (BDAES).....	32
4.2.3 Meio Ágar – Água (MAA).....	33
4.2.4 Meio Aveia-Ágar.....	33
4.2.5 Meio Ágar Extrato de Malte (PATERSON e BRIDGE, 1994).....	33
4.2.6 Meio Completo (MC).....	34

4.2.7 Meio Ágar Mueller Hinton (MHA).....	35
4.2.8 Caldo Extrato de Malte (MEB).....	35
4.2.9 Caldo Nutriente (NB).....	35
4.2.10 Lactofenol incolor.....	35
4.2.11 Lactofenol azul.....	36
4.2.12 Solução de Vitaminas.....	36
4.2.13 Solução salina (p/v).....	37
4.2.14 Solução de Tetraciclina.....	37
4.2.15 Solução para paralisar a germinação de picnidiósporos.....	37
4.2.16 Derozal Bayer®.....	38
4.2.17 Solução de MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazol)-2.5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] Sigma, M-2128.....	38
4.2.18 Tampão de Extração de DNA (TE) (preparado no momento do uso).....	38
4.2.19 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%.....	38
4.2.20. Solução de brometo de etídio.....	39
4.2.21 Clorofil.....	39
4.2.22 Clorofane.....	39
4.2.23 Gel de agarose (0,8 %).....	39
4.2.24 Gel de agarose (1,5 %).....	39
4.2.25 RNase.....	40
4.2.26 Tampão da amostra (6X).....	40
4.2.27 Tampão da corrida TEB 10X pH 8,0.....	40
4.2.28 Tampão TRIS-EDTA.....	41
4.2.29 Marcador de peso molecular.....	41
4.2.30 Marcador de peso molecular (DNA <i>Ladder</i> 100pb Ludwig Biotec).....	41
4.2.31 Oligonucleotídeos (Invitrogen).....	41
4.3. Isolamento dos fungos endofíticos de folhas de espinheira santa.....	42
4.4 Conservação dos fungos endofíticos.....	43
4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	43
4.5.1 Antagonismo contra fungos fitopatogênicos.....	43
4.5.1.1 Técnica de Cultura Pareada.....	44
4.5.1.2 Teste para detecção da produção de metabólitos voláteis.....	45
4.5.1.3 Teste para detecção de metabólitos não voláteis.....	46
4.5.2 Avaliação da ação dos extratos.....	47

4.5.2.1 Obtenção dos extratos.....	47
4.5.2.2 Crescimento micelial.....	47
4.5.2.3 Influência na germinação de picnidiósporos e formação do apressório.....	48
4.5.2.4 Formação de picnídios de <i>G. citricarpa</i> em folhas autoclavadas.....	49
4.5.3 Atividade antibacteriana dos endófitos.....	50
4.5.3.1 Obtenção do metabólito.....	50
4.5.3.2 Avaliação da ação antibacteriana.....	50
4.5.3.3 Técnica de bioautografia em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) pelo método do agar-overlay.....	52
4.6 Caracterização morfológica molecular de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	53
4.6.1 Obtenção de colônia monospórica.....	53
4.6.2 Técnica de microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999).....	54
4.6.3 Avaliação da esporulação em diferentes meios de cultura.....	55
4.7 Análise da variabilidade genética por RAPD.....	56
4.7.1 Extração do DNA.....	56
4.7.2 Quantificação do DNA.....	57
4.7.3 Amplificação do DNA – RAPD.....	57
4.7.4 Análise do polimorfismo.....	59
4.8 Análise estatística.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	61
5.1.1. Antagonismo contra fungos fitopatogênicos.....	61
5.1.1.1 Técnica de cultura pareada.....	61
5.1.1.2 Teste para detecção de metabólitos voláteis.....	64
5.1.1.3 Teste para detecção de metabólitos não voláteis.....	66
5.1.1.4 Avaliação da ação dos extratos.....	68
5.1.1.4.1 Influência do crescimento micelial.....	68
5.1.1.4.2 Influência na germinação de picnidiósporos e formação do apressório.....	69
5.1.1.4.3 Formação de picnídios de <i>G. citricarpa</i> em folhas autoclavadas.....	70
5.1.2 Atividade antibacteriana dos endófitos.....	72
5.1.2.1 Avaliação da ação antibacteriana dos extratos.....	72
5.1.2.2 Bioautografia em placas de cromatografia em camada delgada pelo método Agar-overlay.....	73
5.2 Caracterização morfológica e molecular de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	75
5.5.1 Caracterização morfológica de <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	75

5.2.2 Características moleculares de <i>Pestalotiopsis</i> spp. por RAPD	91
6. CONCLUSÕES.....	101
7. REFERÊNCIAS.....	102
ANEXOS.....	119

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE 3 ISOLADOS ENDOFÍTICOS CONTRA O FITOPATÓGENO *Fusarium* sp. 151-2 EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28° 62
- FIGURA 2 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA COLÔNIA DOS FITOPATÓGENOS *G. citricarpa* PC 13/96 E *Fusarium* sp. 151-2 PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS, EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C 63
- FIGURA 3 - ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS HIFAS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96 APÓS EXPOSIÇÃO AO ISOLADO ENDOFÍTICO 70JES, APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO, EM MEIO BDA A 28°C 64
- FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 53JES E 23JES CONTRA O FITOPATÓGENO *Trichoderma* sp. CNB2F16 PELA TÉCNICA DE CULTURA PAREADA EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C 64
- FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FITOPATÓGENOS *Fusarium* sp. 151-2 E *G. citricarpa* PC13/96 POR METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 53JES E 70JES EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C 67
- FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* 33/05, INOCULADAS APÓS RETIRADA DO PAPEL CELOFANE PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C 68
- FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* 33/05 EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C 69
- FIGURA 8 - EFEITO DOS EXTRATOS DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS SOBRE A FORMAÇÃO DE PICNIDIÓSPOROS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* 33/05 EM FOLHAS AUTOCLAVADAS COLOCADAS SOBRE MEIO BDA, APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C 71
- FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA EM CCD *agar-overlay* 74

FIGURA 10 - MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM MEIO BDA, MAV, MEA E MC, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C.....	77
FIGURA 10 - MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM MEIO BDA, MAV, MEA E MC, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C (CONTINUAÇÃO).....	78
FIGURA 10 - MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM MEIO BDA, MAV, MEA E MC, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C (CONTINUAÇÃO).....	79
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DO DIÂMETRO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM MEIO BDA, MAV, MEA E MC, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO, A 28 °C.....	80
FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE ESPORULAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28 °C	82
FIGURA 13 - MICROMORFOLOGIA DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. SV12ES EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C	84
FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE MEDIDAS DO COMPRIMENTO E LARGURA DOS CONÍDIOS E COMPRIMENTO DOS APÊNDICES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C	86
FIGURA 15 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE MEDIDAS DO COMPRIMENTO E LARGURA DOS CONÍDIOS E COMPRIMENTO DOS APÊNDICES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C.....	87
FIGURA 16 - MICROMORFOLOGIA DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 48JES, 14JES E SD07ES DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM MEIO BDA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C.....	88
FIGURA 17- DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.	90
FIGURA 18 - ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.	91

FIGURA 19 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O <i>PRIMER</i> OPX 11 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	93
FIGURA 20 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O <i>PRIMER</i> OPX 18 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	93
FIGURA 21- PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O <i>PRIMER</i> OPX 09 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.	94
FIGURA 22 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O <i>PRIMER</i> OPX 04 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	94
FIGURA 23 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O <i>PRIMER</i> OPX 08 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	95
FIGURA 24 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O <i>PRIMER</i> OPX 12 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. E GRUPO EXTERNO <i>C. boninense</i>	95
FIGURA 25 - DENDROGRAMAS GERADOS A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD	96
FIGURA 26 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS <i>Pestalotiopsis</i> spp. ...	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS EM UMA REAÇÃO DE RAPD	58
TABELA 2 - INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE ESPINHEIRA SANTA E FITOPATÓGENOS ENSAIADOS EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C	61
TABELA 3 – PORCENTAGEM MÉDIA DE INIBIÇÃO DE DIÂMETRO DE COLÔNIAS DOS FITOPATÓGENOS <i>G. citricarpa</i> PC13/96 e <i>Fusarium</i> sp.151-2 PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS, EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C	65
TABELA 4 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR EXTRATOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. DETECTADO PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA EM CCD <i>agar-overlay</i>	74
TABELA 5 – <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD E NÚMERO DE BANDAS AMPLIFICADAS.....	92

RESUMO

BIOPROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ENDÓFITOS DE *Maytenus ilicifolia*, COM ÊNFASE EM *Pestalotiopsis* spp.

Autora: Josiane Aparecida Gomes Figueiredo

Orientadora: Chirlei Glienke

A espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss.), é uma planta medicinal muito utilizada no tratamento de úlceras gástricas e problemas digestivos, devido à citoproteção da mucosa gástrica. É típica da América do Sul, em especial à região Sul do Brasil e atualmente encontra-se ameaçada de extinção. No presente trabalho foram isolados fungos endofíticos e testados quanto ao potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas em humanos e fungos fitopatogênicos, com ênfase em *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta do Citros. Extratos metanólicos de dois isolados exibiram ação fungistática na germinação e no crescimento micelial de *G. citricarpa*. Dois de treze extratos de *Pestalotiopsis* spp. inibiram o crescimento dos microrganismos-teste (*S. aureus* oxalino resistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), usando a técnica de bioautografia em CCD agar-overlay. Dessa forma a avaliação indicou que fungos endofíticos isolados de “espinheira santa” representam um potencial na agricultura e/ou aplicações farmacêuticas, sugerindo estudos futuros. Utilizando marcadores RAPD os fungos endofíticos do gênero *Pestalotiopsis* foram separados em três grupos com 12 diferentes primers. Com nós bem suportados por altos valores de *bootstrap* (de 99 a 100%) compartilhando apenas 16% de similaridade genética, indicando alta variabilidade genética. As informações obtidas em função destes agrupamentos foram confirmadas com análise de características morfológicas, crescendo em meio batata dextrose ágar (BDA), meio completo (MC), extrato de malte ágar (MEA) e meio aveia ágar (MA), foram transformados em uma matriz igualmente analisada pelo software NTSYS (coeficiente Jaccard) com o agrupamento pelo método UPGMA permitindo construção de um novo dendrograma de similaridade morfológica compondo agrupamentos semelhantes, propondo um novo modelo de estudo que torna possível confrontar dados morfológicos com dados moleculares para fungos endofíticos do gênero *Pestalotiopsis* spp.

Palavras chave: endofíticos, espinheira santa, RAPD, *Pestalotiopsis* spp.

ABSTRACT

BIOSPECTRING, MORPHOLOGIC AND GENETIC CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTE OF *Maytenus ilicifolia*, WITH EMPHASIS *Pestalotiopsis* spp.

Author: Josiane Aparecida Gomes Figueiredo

Advisor: Chirlei Glienke

“Espinheira santa” (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss), is a medicinal plant used effectiveness in the treating ulcers and digestive complaints, exhibit propriety cytoprotection gastric mucosa . Is typical of the South America, in the special to the South region of Brasil, nowadays found threatened of extinction. In this work isolated endophytic fungi and tested potential antimicrobial against reference bacteria strains and plant pathogenic fungi with emphasis *G. citricarpa*, causal agent of the Citrus Black Spot (CBS). Methanolic extracts of two isolatedes exhibited fungistatic activity on the germinartion and mycelial growth *G. citricarpa* . Two of the 13 extracts of *Pestalotiopsis* spp. effectively inhibited the growth of the test-microrganisms (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* oxalino resistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*), using the bioautographic TLC agar-overlay technique. Thus, the investigation indicated that endophyte fungi isolated from the “espinheira santa” represent a potential for agricultural and/or pharmaceutical applications and suggested further study. Analysis RAPD marker isolated endophytic fungi *Pestalotiopsis* by 12 different primers revealed high levels genetic variability. Analyze of morphologic and cultural characteristics, using growth media potato dextrose agar (PDA), complete medium (CM), malt extract agar (MEA) and oat dextrose agar (ODA) provided morphological data were transformed matrix equally analyzed by NTSYS software (Jaccard coefficient), using UPGMA grouping method originated a new dendrograma of morphologic similarity composing similar groupings with, purpose a new model of study to correlate morphologic with molecular data for endophyte fungi of the *Pestalotiopsis* spp.

Key words: endophytes, espinheira santa, RAPD, *Pestalotiopsis* spp.

1. INTRODUÇÃO

Todas as plantas até hoje estudadas são hospedeiras de microrganismos endofíticos, os quais associam-se de forma mutualística, competindo com patógenos, diminuindo a herbivoria e o ataque de insetos, aumentando a tolerância a estresses abióticos e bióticos, protegendo a planta e favorecendo seu crescimento, recebendo em contra-partida proteção e nutrientes do seu hospedeiro. Na estreita relação entre endofíticos e planta hospedeira pode ocorrer produção de metabólitos secundários que interferem de alguma forma no desenvolvimento de patógenos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Estudos sobre o potencial destes microrganismos para a área farmacêutica e biotecnológica apresentam-se relevantes, devido à descoberta de novas substâncias para uso terapêutico humano, como por exemplo, antibióticos, antimaláricos e anticancerígenos (STROBEL et al., 1998; STROBEL, 2002; STROBEL e DAISY, 2003).

Por estarem presentes em plantas medicinais, sugere-se, que as suas propriedades terapêuticas poderiam estar no endófito e não na planta, ou provavelmente na sua interação. Atualmente, os fungos endofíticos de plantas medicinais são estudados na busca de novos metabólitos secundários potencialmente úteis. Neste aspecto, destaca-se a espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss), planta medicinal nativa na América do Sul, encontrada principalmente na região sul do Brasil, comumente destinada ao tratamento de úlceras no estômago e outros problemas gástricos. Em função das suas

propriedades medicinais, a espinheira santa encontra-se hoje na lista das espécies ameaçadas de extinção (SEMA, 1995; BITTENCOURT, 2000).

A busca de novos compostos que atuem no controle de fungos fitopatogênicos como o fungo responsável pela doença mancha preta dos citros (MPC), *Guignardia citricarpa* Kiely, faz-se necessária, pois o Brasil destaca-se na citricultura, sendo detentor de um terço da produção mundial, e 85% da produção internacional do suco da fruta, representando uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (AGRIANUAL 2000). A MPC caracteriza-se como uma lesão que apresenta bordas salientes com depressão no centro, onde pode-se observar a presença de picnídios. Estas lesões podem atingir os frutos maduros ou no início de maturação, podendo aparecer após a colheita, no transporte e armazenamento. A MPC afeta principalmente a casca do fruto, sem causar danos internamente, porém a 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. Torna-se evidente a grande importância tanto econômica quanto social dessa atividade e as implicações da presença da doença nos frutos, destacando-se a relevância na busca de microrganismos antagonistas que auxiliem no combate a doença.

São crescentes os relatos de propriedades farmacológicas nos fungos endofíticos. Espécies do gênero *Pestalotiopsis* são importantes na produção de metabólitos secundários (STROBEL e DAISY, 2003). Paralelamente ao avanço na busca dos seus metabólitos encontra-se a dificuldade em inferir a respeito da complexa taxonomia deste gênero.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos principais testar a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de espinheira santa (*M. ilicifolia* Mart. ex. Reiss) e caracterizar a variabilidade genética dos isolados endofíticos por meio de marcadores moleculares RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), e como objetivos específicos:

- Isolar fungos endofíticos de folhas, pecíolos e sementes assintomáticos de espinheira santa (*M. ilicifolia* Mart. ex. Reiss);
- Realizar testes de atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos isolados contra alguns patógenos de humanos e de plantas;
- Selecionar fungos endofíticos de espinheira santa (*M. ilicifolia* Mart. ex. Reiss) capazes de inibir o desenvolvimento do fitopatógeno *G. citricarpa* Kiely, agente causal da Mancha Preta dos Citros;
- Caracterizar morfologicamente e determinar a variabilidade genética dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. por meio de marcadores moleculares RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microrganismos endofíticos

De acordo com BACON e WHITE (2000), microrganismos endofíticos são organismos que colonizam tecidos internos das plantas sem causar qualquer efeito negativo imediato. Não existe uma exata distinção entre as categorias de microrganismos epifíticos, endofíticos e patogênicos. AZEVEDO (1998) sugere que um microrganismo epifítico pode, eventualmente, ser encontrado dentro de um vegetal; um endofítico, em certas condições, pode tornar-se um patógeno e um patógeno, em determinadas condições, não afeta o seu hospedeiro, podendo ser considerado um endófito.

Potencialmente úteis, os microrganismos endofíticos podem ser utilizados como fontes de metabólitos primários (STAMFORD et al., 1998) e secundários, como o taxol, uma droga quimioterapêutica usada no tratamento de câncer de mama e ovário (WANG et al., 2000 e STROBEL et al., 2000; 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.

Os microrganismos endofíticos encontrados nos vegetais são fungos e bactérias, sendo os fungos mais freqüentes. Muitos são capazes de produzir

metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos (LI et al., 2001; LI e STROBEL, 2001; ZOU e TAN, 2001), anti-helmínticos e inseticidas (AZEVEDO et al., 2000; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004), apresentando grande potencial que pode ser explorado na agricultura (ZOU e TAN, 2001).

SCHULZ et al. (2002) isolaram, em doze anos de estudos, 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.

No milho foi observado que em plântulas provenientes de sementes inoculadas com uma linhagem endofítica de *Fusarium moniliforme*, ocorreu maior deposição de lignina nas raízes, sugerindo que esta característica confere maior resistência contra patógenos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

O fungo endofítico *Muscudor vitigenus* isolado do cipó *Paullinia paullinioides* na Amazônia do Peru, produz naftaleno que atua como um repelente de insetos (DAISY et al., 2002 a; b).

A presença de fungos endofíticos na árvore tropical *Theobroma cacao* (Malvaceae) no Panamá, confere a defesa da planta contra um dos seus maiores patógenos, *Phytophthora* sp. (ARNOLD et al., 2003).

A presença de criptocandina, lipopeptídeo antimicótico (STROBEL et al., 1999), além de outros antibióticos, antidiabéticos e compostos imunossupressores isolados de fungos endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003), sugerem sua importância para a indústria farmacêutica.

O fungo endofítico de gramíneas *Neotyphodium* sp. apresenta metabólitos ativos como a ergopeptina e ergovalina, que atuam no sistema nervoso central elevando a temperatura corpórea, provocando vasoconstrição e reduzindo os níveis de prolactina nos animais. Neurotoxinas Lolitrem A e B causam a dificuldade na movimentação dos animais que se alimentam da gramínea. A peramina, pirrolizidina e a pirrolopirazina atuam como um inseticida, tornando a planta menos atrativa para os insetos. *Neotyphodium* aumentou a tolerância à seca para seu hospedeiro *Festuca aerundinacea*, o crescimento da raiz, a produção de sementes, germinação, captação de fósforo e resistência a nematóides e insetos (SAIKKONEM et al., 1998; PANACCIONE et al., 2001).

Os microrganismos endofíticos penetram nos tecidos vegetais de seus hospedeiros pelos estômatos e raízes, ferimentos ou cicatrizes, ou ainda através da secreção de enzimas hidrolíticas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

A partir do isolamento, eles podem ser observados por diferentes métodos, sendo que a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitou a STROBEL (2000) detectar acérvulos de *Pestalotiopsis microspora* e estruturas sexuadas de *P. hansenii*, ambos fungos endofíticos produtores de taxol.

PIMENTEL (2001), observou conídios, conidióforos e fiálides dos fungos endofíticos entomopatogênicos *Beauveria* sp. isolados do milho e *Paecilomyces* sp. isolados do milho e da soja.

GLIENKE-BLANCO et al. (2002), analisando a variabilidade genética do endofítico *G. citricarpa* de citros observaram picnidiósporos, conidióforos, ascos jovens, ascósporos, hifas e outras estruturas através de microscopia ótica.

Independentemente dos métodos utilizados para detecção dos microrganismos endofíticos, são importantes os cuidados que devem ser tomados durante o processo de isolamento, removendo a microbiota epifítica e outros contaminantes externos da superfície das folhas, pecíolos e sementes.

Existe uma diversidade enorme de microrganismos endofíticos presentes no interior de plantas saudáveis com grande potencial para serem estudados. DREYFFUS e CHAPELA (1994) estimam que ocorram, no mínimo, um milhão de espécies de fungos endofíticos. No Brasil, exemplos desta diversidade podem ser encontrados nos trabalhos de PEREIRA (1993); PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI (1993); GLIENKE (1995); SOUZA (1996); ARAÚJO (1996); RODRIGUES e DIAS-FILHO (1996); AZEVEDO (1998); MAITAN (1998); ARAÚJO et al. (2000); PIMENTEL et al. (2001a); PIMENTEL et al. (2001b); SOUZA, ASTOLFI e PEREIRA (2001); SOUZA et al. (2004); RUBINI et al. (2005); ALMEIDA, YARA e ALMEIDA (2005).

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 frequentes (CARROLL e CARROLL, 1978; ARNOLD, 2003).

ERNEST, MENDGEN e WIRSEL (2003) investigaram a interação entre o fungo endofítico *Stagonospora* spp. e *Pharagmites australis* e evidenciaram que a colonização do hospedeiro ocorre de forma diferenciada no decorrer do ano. Na primavera o endófito foi encontrado somente na raiz, enquanto no outono ele é encontrado em todo o vegetal.

Tanto a planta hospedeira como a região onde os endofíticos são isolados podem 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 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. 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 JR et al., 1993; CLAY, 2004).

3.2 Fungos endofíticos de plantas medicinais

Metabólitos com atividade antimicrobiana contra patógenos humanos e de plantas foram produzidos pelo fungo *Colletotrichum* sp., um endófito da planta medicinal *Artemisia annua*, tradicionalmente utilizada pelos chineses como uma droga antimalárica, reconhecida pela síntese de uma substância conhecida como artemisina (LU et al., 2000). O fungo endofítico *C. gloeosporioides* da *A. mongólica* sintetiza ácido coletótrico que apresenta atividade antimicrobiana (ZOU et al., 2000).

A criptocandina, um lipopeptídeo antimicótico, produzido pelo fungo endofítico *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* isolado da planta medicinal *Tripterigeum wilfordii* (Celastraceae), demonstrou excelente atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. A criptocandina também possui atividade contra fitopatógenos, incluindo *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (STROBEL et al., 1999).

Na região norte da Austrália, uma planta conhecida popularmente como “cobra trepadeira” (*Kennedia nigriscans*), é usada pelos nativos da região como cicatrizante de infecções da pele. CASTILLO et al. (2002), descreveram antibióticos de amplo espectro produzidos por *Streptomyces* sp. (NRRL 30562): as munumbicinas A, B, C e D, antibióticos que demonstraram atividade contra bactérias gram-positivas como *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium tuberculosis*. Porém, o que mais chamou atenção dos pesquisadores foi o potencial contra o parasita da malária, *Plasmodium falciparum*.

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; 1996) 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).

3.3 Espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss)

3.3.1 Considerações Gerais

A espinheira santa é uma espécie 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, 1994) ou estacas de galho. É nativa da América do Sul, encontrada no leste da Argentina, Paraguai, Bolívia, Chile e Uruguai. No Brasil é predominante nos estados do Sul (CARVALHO-OKANO, 1992).

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-divina, erva-cancrosa e erva-santa (CARVALHO-

OKANO, 1992); cancorosa-de-Deus, limãozinho, maiteno, marteno, pau-josé, salva-vidas, sombra-de-touro (BITTENCOURT, 2000) no Brasil.

3.3.2 Características morfológicas

A espinheira santa pertence à classe Magnoliopsida, ordem Celastrales, família Celastraceae, que compreende cerca de 50 gêneros e 800 espécies (CRONQUIST, 1981). CARVALHO-OKANO (1992); RAMDOMSKI (1998); BITTENCOURT (2000), descrevem a espinheira santa como:

“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; 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”.

3.3.3 Componentes químicos e propriedades terapêuticas

Tribos indígenas e populações rurais do Paraguai e Bolívia utilizam a espinheira santa como um agente regulador da fertilidade (CORDEIRO, VILEGAS e LANÇAS, 1999) e no Paraguai e Argentina é usada como

contraceptivo e abortiva (MONTANARI, CARVALHO e DOLDER, 1998). Outras indicações populares citam a espinheira santa contra: febres palustres (MEIRA PENNA, 1946), afecções pruriginosas cutâneas (COIMBRA, 1958), dispepsias (CRUZ, 1965) e como abortiva (BASUALDO, 1995). O uso mais comum é no tratamento de gastrites e úlceras gástricas e duodenais.

CORSINO et al. (2003), isolaram do extrato obtido de folhas e cascas da raiz de *M. aquifolium* (Celastraceae) cinco componentes com propriedades antioxidantes.

MONTANARI, CARVALHO e DOLDER (1998), avaliaram os efeitos de extratos etanólicos de *M. ilicifolia* na espermatogênese de camundongos, comprovando que extratos etanólicos da planta medicinal não causam distúrbios na espermatogênese. 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. GONZALEZ et al. (2001) avaliaram os efeitos analgésicos e anti-ulcerogênicos de *M. aquifolium*. BERSANI-AMADO et al. (2000) avaliaram a atividade anti-ulcerígena com spray de extrato seco de *M. aquifolium*. JORGE et al. (2004) avaliaram a eficácia de extratos de *M. ilicifolia* como anti-inflamatório, na proteção contra lesões gástricas, no que diz respeito a cicatrização e citoproteção.

SOUZA-FORMIGONI et al. (1991) demonstraram a potencialidade dos efeitos anti-ulcerogênicos das folhas de espinheira santa comparando com a 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. Triterpenos são capazes de estimular fatores atuantes na proteção da mucosa gástrica, como a produção de muco e prostaglandinas (ITOKAWA et al., 1991; 1993 e SHIROTA et al., 1994).

FERREIRA et al. (2004) detectaram a ação do extrato aquoso liofilizado de *M. ilicifolia* na proteção da mucosa gástrica. A secreção ácida é bloqueada por receptores antagonistas de histamina, comprovando sua propriedade anti-ulcerogênica comparados com a cimetidina, um potente agente na supressão de ácido gástrico e pepsina.

PILEGGI (2006) isolou, caracterizou e avaliou o potencial antimicrobiano de microrganismos endofíticos de folhas, pecíolos e sementes de *M. ilicifolia*. Nos isolamentos de folhas e pecíolos, os fungos filamentosos foram mais frequentes do que as bactérias. Em sementes ocorreu o inverso, sendo predominante o isolamento de bactérias. Em folhas foram isolados os gêneros *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Bipolaris* sp., *Phyllosticta* sp. e *Cladosporium* sp.; em pecíolos, os gêneros *Alternaria* sp. e *Cladosporium* sp., e em sementes *Cladosporium* sp. e *Pestalotiopsis* sp.

3.4 Mancha preta do citros e *Guignardia citricarpa* Kiely

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).

Caracteriza-se por apresentar lesões com bordas salientes e com depressão no centro, onde observam-se 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) (FEICHTENBERGER, 1996).

O agente causador da MPC é o fungo *G. citricarpa* Kiely, ascomiceto, Loculoascomiceto, pertencente à ordem Dothideales e família Dothideacea. Caracteriza-se por apresentar uma fase anamórfica (fase assexuada), descrita como *Phyllosticta citricarpa*, e uma fase teleomórfica ou sexuada descrita como *G. citricarpa*. Geralmente, ambas as formas são encontradas associadas. A fase assexuada corresponde à produção de picnidiósporos, que são unicelulares, ovóides, elípticos ou subglobosos, levemente clavados quando jovens, apresentando a base truncada, arredondada e denteada no ápice, com uma membrana gelatinosa recobrimo-os (GLIENKE, 1995; GLIENKE-BLANCO et al, 2002). 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).

O ciclo da MPC pode ocorrer de duas maneiras: através dos picnidiósporos ou conídios (esporos assexuais) e dos ascósporos (esporos sexuais). Os picnidiósporos são encontrados em frutos sintomáticos, folhas caídas ou aderidas, ramos mortos e pedúnculos dos frutos, sendo responsáveis pela infecção à curta distância, sendo disseminados pela água da chuva, orvalho ou irrigação. Os ascósporos são encontrados em folhas caídas e em decomposição, sendo responsáveis pela infecção tanto à longa quanto à curta distância, pois são liberados pelo peritécio e podem ser carregados por correntes aéreas (ROBBS e BITTENCOURT, 1995; FEICHTENBERGER, 1996).

A MPC afeta apenas a casca do fruto e o flavedo (epicarpo), sem causar danos 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 a queda precoce do mesmo, aumentando as perdas na produção, já que esses frutos não são colhidos (GÓES et al., 2005).

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.

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[®] 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*.

3.5 Antagonismo entre microrganismos

O termo antagonista emprega-se aos agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. Desta forma o nicho ecológico ocupado pelos endófitos favorece o controle biológico, pois neste local podem competir por nutrientes e espaço com os patógenos, bem como produzir substâncias tóxicas a estes organismos ou ainda, induzir a planta a desenvolver resistência às doenças (MELO e AZEVEDO, 1998).

ARNOLD et al. (2003) comprovaram o antagonismo entre fungos endofíticos do cacau (*Theobroma cacao*) e o fitopatógeno *Phytophthora infestans*.

Fungos endofíticos foram isolados de árvores de cacau e inoculados em mudas estéreis. Posteriormente, nas mesmas mudas foi inoculado o fitopatógeno. Surpreendentemente, mudas inoculadas com os endófitos tiveram apenas uma pequena ocupação do fitopatógeno em suas folhas. Comprovando que a interação entre os microrganismos endofíticos e o hospedeiro, têm efeito negativo sobre o fitopatógeno, resultando na inibição do seu crescimento.

MARTINS-CORDER e MELO (1998) realizaram diferentes testes de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Verticillium dahliae* KLEB, demonstrando ampla capacidade antagonista. Através da secreção de metabólitos tóxicos por *Trichoderma* spp., ocorreu a degradação das hifas hospedeiras, que inibiu o desenvolvimento de *V. dahliae*. Segundo os pesquisadores, os mecanismos de controle biológico podem ocorrer ao longo do processo de vida do antagonista, os quais se sobrepõem e prejudicam a vida dos competidores.

A seleção de antagonistas baseia-se em evidências de que o organismo candidato interfere, de algum modo, no desenvolvimento do patógeno. Esta interferência implica em algumas formas de destruição ou inibição, podendo ser avaliada primeiramente *in vitro* e depois *in vivo*, conforme descreveram RUBINI et al. (2005). O grupo isolou fungos endofíticos do cacau (*Theobroma cacao* L.) e realizou testes de antagonismo contra o patógeno: *Crinipellis pernicioso*, agente causador da doença “Vassoura da Bruxa”, fator limitante na produção do fruto nas Américas.

Ainda em relação a *C. pernicioso*, DE MARCO, IGLIS-VALADARES e FELIX (2003) descrevem a produção de enzimas hidrolíticas produzidas por cepas do gênero *Trichoderma*, importantes no controle deste fitopatógeno.

BARBOSA et al. (2001) investigaram o antagonismo entre espécies de *Trichoderma* contra *Cladosporium herbarum*, causador de verrugose em frutos de maracujá.

SHALINI, LATA e KOTASTHANE (2006) demonstraram a atuação de isolados de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani*, onde a hifa se enrola em torno do patógeno, penetra, causa a lise e, conseqüentemente, morte do patógeno.

O antagonismo entre microrganismos foi relatado em diversos trabalhos (LINHARES et al., 1995; MARTINS-CORDER e MELO, 1998; MOURA e ROMEIRO, 1999; ETHUR, CEMBRANEL e SILVA, 2001; AMORIM e MELO, 2002; MOREIRA et al., 2002; MONTEALEGRE et al., 2003; KUPPER, GIMENES-FERNANDES e GOES, 2003; ETHUR et al., 2005).

3.6 Controle biológico

Segundo BETTIOL (1991), doença é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e diversos não patógenos que habitam o sítio de infecção e que por conseqüência, apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Para o autor, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico.

COOK e BAKER (1983) definem controle biológico como “*a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, realizada por/ou através de um ou mais organismos que não o homem*”.

O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre microrganismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação: antibiose, predação, indução de resistência da planta hospedeira, micoparasitismo, produção de enzimas e toxinas, colonização sistêmica da planta hospedeira, competição de nutrientes e sítios de colonização e liberação de enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da parede celular (BETTIOL, 1991; MELO e AZEVEDO, 1998).

Atualmente, diversos microrganismos são utilizados como agentes no controle de fungos fitopatogênicos, entre eles podemos citar espécies de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pythium*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, entre outros (MELO e AZEVEDO, 1998).

Os testes de seleção de microrganismos com potencial para o controle biológico podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*, em condições controladas ou em condições naturais. Ambos os métodos são complementares. Os principais métodos de seleção de microrganismos *in vitro* descritos são: pareamento de culturas, papel celofane, placa sobreposta, líquido metabólico, etc (MARIANO, 1993). A seleção de microrganismo *in vivo* é realizada através da aplicação do antagonista, seguida da inoculação do patógeno no hospedeiro por meio de pulverização de suspensão de células, imersão de raízes, ferimentos, dentre outros (MELO e AZEVEDO, 1998).

Após o isolamento e seleção de um antagonista, o emprego de microrganismo como agente de controle biológico de fitopatógenos, ocorre principalmente por meio do tratamento das sementes, do solo, das partes aéreas das plantas e pós-colheita.

3.7 Substâncias antimicrobianas produzidas por fungos endofíticos

Na interação mutualística entre a planta hospedeira e os microrganismos endofíticos ocorre a produção de uma grande variedade de substâncias, tais substâncias apresentam potencial para o uso na medicina moderna, agricultura e indústria, conforme propõem AZEVEDO (1999); ZOU e TAN (2001); STROBEL e DAISY (2003).

A Leucostatina A, produzida pelo endófito *Neotyphodium* sp. apresenta propriedades antifúngicas e anticancerígenas (ZOU e TAN, 2001; WHITE JR et al., 2003; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

A planta *Spondias mombin* (Anacardiaceae) é utilizada no Brasil devido às suas propriedades antimicrobianas. A avaliação dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos isolados desta planta demonstraram excelentes resultados na inibição da atividade contra alguns microrganismos.

Os metabólitos produzidos pelo endófito *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 de *Phomopsis* sp. foram eficientes contra *Cladosporium elantum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae* (RODRIGUES, HESSE e WERNER, 2000).

O fungo endofítico *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* produz criptocina, antagonista contra um grande número de fungos fitopatogênicos, especialmente ao fungo *Pyricularia oryzae* (STROBEL e LONG, 1998).

Foi isolado de pequenos ramos de *Cinnamomum zeylanicum* o fungo *Muscodor albus*, que produz componentes orgânicos voláteis capazes de inibir o crescimento ou matar fungos e bactérias (STROBEL et al., 2001).

Citocalasinas são um grupo de metabólitos fúngicos relacionados pela estrutura e atividade biológica, com capacidade antitumoral e atividade antibiótica. Estes metabólitos 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 *Rhinocladiella* sp. de *Tripterygium wilfordii* (WAGENAAR et al., 2000).

SOUZA et al. (2004) testaram a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de duas plantas tóxicas da Amazônia, a *Palicourea longiflora* (albl) e *Strychnoscogens bentham*. Dentre as setenta e nove linhagens de fungos endofíticos selecionadas para ensaios de antagonismo *in vitro*, dezenove delas apresentaram atividade antagônica contra um ou mais microrganismo-teste utilizado.

Na Amazônia Peruana existe uma planta que cresce sobre o tronco de árvores, *Monstera* sp., de onde foi isolado o endófito *Streptomyces* sp. MSU-2110. Este actinomiceto produz um antibiótico peptídeo denominado coronamicina, com atividade antimicrobiana contra o fungo patógeno *Cryptococcus neoformans* e à bactéria *Streptococcus pneumoniae*, mas a melhor atividade foi a demonstrada contra protozoário *Plasmodium falciparum*, sugerindo potencialidade como uma droga antimalárica (EZRA et al., 2004).

Da árvore *Fragraea bodenii* (Gentianaceae), Papua Nova Guine, LI e STROBEL (2001) isolaram o fungo endofítico *Pestalotiopsis jesteri*, que produziu dois metabólitos com atividade antimicótica, o jesterone e o hidroxijesterone.

PELAEZ et al. (1998) detectaram a atividade antimicrobiana de linhagens endofíticas isoladas de nove diferentes plantas coletadas em regiões de solo salino e calcáreo da Espanha e sugerem o potencial considerável destes microrganismos na produção de novos metabólitos.

3.8 *Pestalotiopsis* sp.

Espécies de *Pestalotiopsis* são encontradas como parasitas ou endófitos, presentes no solo ou em ramos, folhas, pecíolos e sementes, respectivamente. São anamórficos pertencentes à ordem Melaconiales, família Amphisphariaceae. Os conidióforos são produzidos dentro do corpo de frutificação compacto, denominado acérvulo (SUTTON, 1980). Os conídios em geral apresentam cinco células, sendo três células medianas de coloração marrom

e duas células (apical e basal) hialinas, com dois ou mais apêndices apicais (JEEWON et al., 2002).

STROBEL et al. (2000) identificaram um novo fungo endofítico do gênero *Pestalotiopsis*, o qual, nomearam de *P. jesteri* em alusão aos três a quatro apêndices terminais dos esporos, parecendo um “chapéu do bobo da corte”. O jesterone e hidroxijesterone são metabólitos secundários de *P. jesteri*, que exibem atividade contra fungos oomycetos (LI et al., 2001).

STROBEL (1996; 1997), declara que *Pestalotiopsis* spp. podem ser um grupo de fungos com grande potencial biotecnológico devido à produção de importantes metabólitos secundários, entre eles o taxol, descoberto inicialmente na planta *Taxus* spp.. O endófito *Pestalotiopsis microspora*, isolado da árvore *Torreya taxifolia*, produz vários compostos com propriedades antifúngicas, incluindo pestalósido, pestalopirona e hidroxipestalopirona (LEE et al., 1996). LI et al. (2001) destacaram a produção de ácido ambuico, um agente antifúngico, produzido por *P. microspora*. STROBEL et al. (2002) detectaram a produção do metabólito isopestacina, por *P. microspora* com propriedades antifúngicas e antioxidantes.

Segundo STROBEL et al. (2000), o endofítico *P. microspora* (NE-32) isolado de *Taxus wallichiana*, apresentou um enorme potencial na produção de taxol. LI et al. (2005) isolaram fungos endofíticos de plantas medicinais utilizadas na China, destacando-se entre eles espécies do gênero *Pestalotiopsis* com atividade antitumoral e atividade antimicrobiana.

Há um número variado de espécies de *Pestalotiopsis* relacionados com doenças em folhas e frutos, conforme descrevem CARDOSO, MAIA e PESSOA (2002), onde a espécie *P. psidii* foi relatada como patógeno causando a doença conhecida como podridão no caule da goiabeira, no estado do Ceará, Brasil.

Também no Brasil, no estado do Pará, foi isolado *P. cruenta*, causando manchas nas folhas e lesões no fruto do mangostão (*Garcinia mangostana* L.) (BASTOS; BEZERRA e SANTOS, 2001). AMORIM (1999) isolou em Alagoas, Brasil, a espécie *P. guepinii* causando doença em antúrio (*Anthurium andraeanum*), uma planta ornamental muito comum nos jardins e a espécie de *P. longisetula* (Guba) foi identificada associada a lesões em morangueiro (CAMILI, CARBONARI e SOUZA, 2002).

Pestalotiopsis spp., em determinadas condições, causa doença severa em plantas da família Rosaceae, conforme estudos realizados na Indonésia (WIDYASTUTI, 2001). No Norte e Nordeste do Brasil há relatos de queda de folíolos em visgueiro (*Parkia pendula* Benth), uma planta comum em matas primárias e secundárias (ROSA e CAVALCANTI, 2005).

HOPIKINS e McQUILKEN (2000), YASUDA, KOBAYASHI e IZADA (2003) e KEITH, MAILE e ZEE (2006), relatam espécies de *Pestalotiopsis* causando doença em plantas ornamentais, frutos de caqui japonês e da goiaba, respectivamente. Com exceção dos isolados de plantas ornamentais identificados como *P. sydowiana*, tanto no caqui quanto na goiaba estavam

presentes mais de três espécies diferentes de *Pestalotiopsis*, dados confirmados com análise de rDNA.

HOPIKINS e McQUILKEN (2000) realizaram testes de patogenicidade dos isolados das plantas. Avaliaram o crescimento e a morfologia das colônias em diferentes meios de cultura, os efeitos de temperatura, pH e potencial osmótico, destacando o meio ágar-água e o meio de cereais com menor crescimento das colônias; temperatura ideal de crescimento de 20 a 25°C, com inibição de crescimento a 35°C. O melhor crescimento micelial ocorreu com pH 5,5 em BDA osmoticamente ajustado entre 1,2 a 2,1 MPa de NaCl.

KEITH, MAILE e ZEE (2006) avaliaram os efeitos de temperatura influenciando o crescimento micelial e obtiveram as mesmas informações que HOPIKINS e McQUILKEN (2000), porém, com espécies diferentes de *Pestalotiopsis*.

3.8.1 Taxonomia de *Pestalotiopsis* sp.

A classificação do gênero *Pestalotiopsis*, segundo muitos taxonomistas, baseou-se durante muitos anos, em características que incluem tamanho, septação, pigmentação do conídio e ausência ou presença de apêndices (NAG, 1993; SUTTON, 1980).

JEEWON et al. (2002) destacaram outros gêneros com características semelhantes ao *Pestalotiopsis* como: *Bartalinia*, *Discosia*, *Monochaetia*, *Pestalotia*, *Seiridium*, *Seimatosporium* e *Truncatella*. Os autores propuseram uma análise molecular baseada nas seqüências de rDNA, agregando as

informações das características morfológicas para resolver problemas na taxonomia entre os gêneros, determinando uma nova chave de classificação, destacando como características do gênero *Pestalotiopsis*, conídios com células medianas pigmentadas (versicolor ou concolor), euseptadas, com dois a quatro apêndices apicais e um apêndice basal central, sempre presente.

Entretanto, o gênero *Pestalotiopsis* é complexo. JEEWON et al. (2003) relataram que taxonomistas como STEYAERT (1949); GUBA (1961); SUTTON (1980) e NAG (1993) determinaram um esquema apropriado para as diferentes espécies de *Pestalotiopsis*. STEYAERT (1949), divide as espécies do gênero baseando-se no número de apêndices apicais; GUBA (1961), as espécies são classificadas de acordo com a diferença na pigmentação de células medianas, formando dois grupos distintos: “concolor” (pigmentação uniforme) e “versicolor”, subdividindo o segundo em oliváceo ferruginoso e oliváceo escuro, além de utilizar critérios como o tamanho do conídio e apêndices. NAG (1993), destaca que células medianas exibem grau de pigmentação variável entre as espécies e sugere a utilização do tamanho do conídio e apêndices. SUTTON (1980) e NAG (1985) ressaltam a importância da conidiogênese para a identificação de muitas espécies. Como se não bastassem divergências nos critérios de classificação, muitos autores descrevem e renomeiam espécies de *Pestalotiopsis*.

Tendo em vista estas diferenças, JEEWON et al. (2003) confrontaram as características morfológicas empregadas na taxonomia de espécies de *Pestalotiopsis* com a análise molecular filogenética e propuseram que a

classificação taxonômica considere os seguintes critérios: pigmentação de células medianas; morfologia dos apêndices apicais, comprimento dos apêndices apicais e comprimento do esporo.

KEITH, MAILE e ZEE (2006), analisando a morfologia dos conídios e das colônias, tentaram correlacionar com dados moleculares, destacando no trabalho a dificuldade de analisar simultaneamente as informações moleculares e morfológicas.

3.9 Marcadores moleculares do tipo RAPD

WILLIAMS et al. (1990), descreveram a técnica de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), que permite de maneira rápida, avaliar o grau de similaridade entre genótipos, em níveis inter e intraespecífico. No mesmo ano e na mesma edição da revista, mas independentemente, WELSH e McCLELLAND (1990), propuseram Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction (AP-PCR), nome mais adequado para a técnica, pois os primers são arbitrários.

Os marcadores de RAPD permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética. Em geral, os dados são obtidos na forma de matriz composta por certo número de genótipos que podem ser variedades, isolados ou clones, genotipados para dezenas ou centenas de marcadores RAPD, obtidos com um ou mais *primers*. São ferramentas importantes para verificar a variabilidade existente entre diferentes isolados de uma mesma espécie e permitem verificar o grau de relação genética entre estes isolados (AUFAVRE-BROWN, COHEN e HOLDEN, 1992).

WELSH e McCLELLAND (1990) e MILCHEMORE, PARAN e KESSELI (1991), enfatizam como vantagem da utilização deste método para análise do DNA de muitos microrganismos, a não necessidade de conhecer previamente a bioquímica e fisiologia do organismo que está sendo estudado.

No RAPD, a reação de amplificação procede em condições de baixa estringência, permitindo que ocorra o pareamento entre os iniciadores e o DNA-alvo, mesmo que não haja complementaridade total entre as duas seqüências. Como resultado, obtém-se um conjunto de fragmentos amplificados os quais, separados por eletroforese em gel, produzem um padrão de bandas específico.

SILVA-MANN et al. (2002) associaram informações de teste de patogenicidade com marcadores bioquímicos e moleculares de DNA/RAPD, visando à identificação e diferenciação do complexo *Colletotrichum*. Pelo teste de patogenicidade dos dez isolados, três foram classificados como causadores de antracnose e sete de ramulose. Marcadores bioquímicos não foram eficientes para a distinção destes isolados. Entretanto, pela análise do RAPD, o valor de similaridade encontrado para os dois grupos foi de 51,7%, confirmando a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos.

O ensaio de RAPD é o método de escolha para muitos estudos, uma vez que é sensível, rápido e relativamente simples, além de não requerer informações acerca da seqüência nucleotídica do DNA genômico. O RAPD tem sido amplamente utilizado para o estudo de diversos grupos de seres vivos, sendo extremamente útil para estudos de identificação taxonômica (LIU et al., 1995; YUAN et al., 1995; GUZMÁN et al., 1999; BLANCO, 1999), análise de

variabilidade da virulência em fungos fitopatogênicos (COOKE et al., 1996; FERNANDEZ e HANLIN, 1996; MOSTAFA et al., 2002; ARAYA, ALLEYENE e STEADMAN, 2004; BELABID et al., 2004), caracterização de raças (BOWDITCH et al., 1991; GUTHRIE et al., 1992; JIMENEZ-GASCO, PÉREZ-ARTÉS e JIMÉNEZ-DIAZ, 2001), variabilidade inter e intraespecífica de populações de diferentes regiões (LIEW e IRWIN, 1994; GUZMÁN et al., 1995; JAMIL et al., 2000; ROY, SIMON e LAPOINTRE, 2000) e também podem ser utilizados para evidenciar mecanismos de recombinação em fungos filamentosos (DALZOTO et al., 2003).

3.9.1 RAPD em microrganismos endofíticos

GLIENKE (1995) e GLIENKE-BLANCO et al. (2002) por meio do método de RAPD, encontraram alta variabilidade genética em isolados endofíticos de *G. citricarpa* de citros e verificaram a existência de duas espécies distintas, uma *G. citricarpa*, responsável pela mancha preta de citros e a outra, *G. mangiferae*.

PENNA (2000) analisou a variabilidade genética de vinte e quatro isolados do fungo endofítico *Phyllosticta* sp. presentes em erva-mate (*Ilex paraquariensis*, ST.HIL.).

KASSAWARA (2005), analisou ampla variabilidade genética, com marcadores RAPD, de 83 isolados de *Fusarium* sp. PAMPHILE e AZEVEDO (2002) utilizaram a técnica de RAPD em estudos de isolados endofíticos de *F. oxysporum* obtidos de sementes de milho. Com RAPD, RIBEIRO (1995)

caracterizou 17 isolados do gênero *Penicillium* endófitos provenientes de *Zea mays*, o que permitiu separá-los em grupos. STRINGARI (2004) separou linhagens de *Guignardia* spp. em cinco grupos principais, classificando o gênero e a espécie isolada de plantas sadias de citros e manga por meio de marcadores RAPD.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Fungos endofíticos de espinheira santa

Sessenta e seis isolados endofíticos foram avaliados. Deste total, 42 foram isolados de folhas de *M. ilicifolia* (espinheira santa) no mês de junho de 2005, no Centro Nacional de Pesquisa de Floresta (CNPFF) da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada no município de Colombo, Paraná. Os demais foram cedidos cordialmente por PILEGGI (2006), obtidos de amostras de folhas, pecíolos e sementes do mesmo hospedeiro, coletados no mesmo local, nos anos de 2004/2005 e fazem parte do banco biológico do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

4.1.2 Microrganismos usados para teste de antagonismo e atividade antimicrobiana

Para determinar a atividade antimicrobiana dos isolados, foram utilizadas as seguintes linhagens: *Fusarium* sp. 151-2, fitopatógeno da cultura do

milho, *Trichoderma* sp. CNBP2F16, fitopatógeno da cultura do café, *G. citricarpa*, linhagens PC 13/96 e 33/05, agente causal da MPC. Todas pertencentes ao banco biológico do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná.

Para levantamento dos isolados com potencial antibacteriano foram utilizados como microrganismos testes as bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Micrococcus luteus* (ATCC 9314) e MARSa (*S. aureus* oxalino resistente), cedidas pelo Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

4.1.3 Fungos endofíticos utilizados para análise de variabilidade genética

Como grupo externo, para análise de variabilidade genética por RAPD, foi utilizado *Colletotrichum boninense*, endófito de espinheira santa, cedido cordialmente por PILEGGI (2006). Três espécies endofíticas de *Pestalotiopsis* utilizadas como linhagens referências: **GaC2 1.1** *P. phothiniae*, **MpCe1 1.3** *P. neglecta voucher* e **GaFr1 2.3** *P. virgulata*, isolado de caule de *Gustavia* cf. *elíptica*, de caule de *Muraya paniculata* e fruto de *G. elíptica*, cedidas cordialmente pelo Prof^o Dr. José Odair Pereira, da Universidade Federal do Amazonas.

4.2 Meios e soluções

4.2.1 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Batata descascada e cortada	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	p/1000,0 mL

As batatas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 20 minutos. Filtrou-se 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.

4.2.2 Meio Ágar-Dextrose-Folha de espinheira santa (BDAES)

Folhas de espinheira santa	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	p/1000,0 mL

As folhas foram lavadas e batidas no liquidificador com 200 mL de água destilada, até a mistura ficar homogênea. Filtrou-se 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, foi acrescentado o ágar.

4.2.3 Meio Ágar – Água (MAA)

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

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

4.2.4 Meio Aveia-Ágar

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

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.

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

Extrato de malte	20,0 g
Glicose	20,0 g
Peptona	1,0 g
Ágar	15,0 g

Água destilada p/1000,0 mL

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

4.2.6 Meio Completo (MC)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
Água destilada	p/1000,0 mL
Ágar	15,0 g

Os ingredientes foram misturados, exceto o ágar, em água destilada sob agitação. Completou-se o volume 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.

4.2.7 Meio Ágar Mueller Hinton (MHA)

Infusão de carne bovina	30,0 g
Peptona de caseína ácida	17,5 g
Amido	1,5 g
Ágar	17,0 g
Água destilada	p/1000,0 mL

4.2.8 Caldo Extrato de Malte (MEB)

Extrato de malte	20,0 g
Glicose	20,0 g
Peptona	1,0 g
Água destilada	p/1000,0 mL

4.2.9 Caldo Nutriente (NB)

Peptona de gelatina	5,0 g
Extrato de carne bovina	3,0 g
Água destilada	p/1000,0 mL

4.2.10 Lactofenol incolor

Hidrato de cloral cristalizado	80,0 g
--------------------------------	--------

Ácido láctico puro	20,0 g
Fenol	20,0 g

4.2.11 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.

4.2.12 Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido p-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.

4.2.13 Solução salina (p/v)

NaCl	8,5 g
------	-------

Água destilada	1000,0 mL
----------------	-----------

Autoclavou-se durante 20 minutos a 1 atm e guardou-se em refrigerador a 4°C.

4.2.14 Solução de Tetraciclina

Tetraciclina	1,0 g
--------------	-------

Etanol absoluto	20,0 mL
-----------------	---------

Preparou-se a solução sob agitação e estocou-se em frasco escuro a – 20°C.

4.2.15 Solução para paralisar a germinação de picnidiósporos (CARDOSO-FILHO, 2003)

Metanol	27,0 mL
---------	---------

Formol 37%	15,0 mL
------------	---------

Água destilada	63,0 mL
----------------	---------

4.2.16 Derozal Bayer®

Carbendazim	10,0 mg
Água destilada	10,0 mL

4.2.17 Solução de MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazol)-2.5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] Sigma, M-2128

MTT	25 mg
Água destilada esterilizada	p/10 mL

Diluíram-se 25 mg de MTT em água destilada autoclavada, até atingir o volume final de 10 mL.

4.2.18 Tampão de Extração de DNA (TE) (preparado no momento do uso)

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

4.2.19 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%

SDS	10,0 g
Água destilada	100,0 mL

A solução foi autoclavada e mantida a temperatura ambiente.

4.2.20. Solução de brometo de etídio

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

4.2.21 Clorofil

Clorofórmio	240,0 mL
Álcool isoamílico	10,0 mL

4.2.22 Clorofane

Fenol	100,0 mL (50%)
Clorofórmio	100,0 mL (50%)

4.2.23 Gel de agarose (0,8 %)

Agarose	0,8 g
Tampão TEB 1X	100,0 mL

4.2.24 Gel de agarose (1,5 %)

Agarose	1,5 g
---------	-------

Tampão TEB 1X	100,0 mL
---------------	----------

4.2.25 RNase

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.

4.2.26 Tampão da amostra (6X)

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

4.2.27 Tampão da corrida TEB 10X pH 8,0

Trizma base	54,0 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	27,5 g
EDTA	4,65 g
Água destilada	100,0 mL

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

4.2.28 Tampão TRIS-EDTA

Tris-HCl pH 7,6	10,0 mM
EDTA pH 8,0	1,0 mM

4.2.29 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 5 µL do marcador

4.2.30 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 esterilizada. Na corrida eletroforética foram utilizados 15 µL do marcador.

4.2.31 Oligonucleotídeos (Invitrogen)

Adicionou-se 10 mM de Tris-HCl pH7,0 aos oligonucleotídeos, inicialmente em forma de precipitados liofilizados, para obter uma solução

estoque com concentração igual a 50 μM . No momento do uso, a solução estoque foi diluída para obter uma solução de concentração 4 μM .

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

4.3. Isolamento dos fungos endofíticos de folhas de espinheira santa

Para coleta, deu-se preferência para folhas sem marcas, arranhaduras ou ferimentos. A metodologia utilizada para o isolamento foi descrita por PETRINI (1986). Após a coleta, as folhas foram colocadas em sacos plásticos, etiquetou-se e levou-se imediatamente para o laboratório. No laboratório, as superfícies das folhas foram lavadas em água corrente, com auxílio de uma esponja para a remoção dos microrganismos epifíticos e outros contaminantes.

Antes de iniciar o processo de desinfecção das folhas, os pecíolos foram vedados com parafina derretida, para evitar a entrada dos desinfetantes nos seus tecidos internos. As folhas vedadas foram mergulhadas em frascos com água destilada esterilizada por 1 minuto, no etanol 70% por 1 minuto, no hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 10 minutos, etanol 70% por 30 segundos e por último, em água destilada esterilizada por 6 minutos. Os espinhos das extremidades das folhas foram cortados. Os fragmentos (5-7 mm) foliares, foram transferidos para placas de Petri (90 mm) contendo os meios BDA e BDAES,

adicionados de Tetraciclina (100µg/mL) para impedir o crescimento bacteriano (ARAUJO et al., 2002).

4.4 Conservação dos fungos endofíticos

Todos os isolados endofíticos foram numerados e estocados de duas maneiras:

- Em frascos contendo meio BDA inclinado, mantidos a 4°C, realizando-se repiques mensalmente.
- Dentro de frascos, contendo 1,5 mL de água destilada esterilizada com discos de 5 mm meio BDA contendo micélios e/ou conídios. Repetiu-se o procedimento a cada três meses.

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.5.1 Antagonismo contra fungos fitopatogênicos

Um levantamento inicial utilizando a Técnica de Cultura Pareada (MARIANO,1993) foi realizado para avaliação do antagonismo dos isolados endofíticos contra fitopatógenos, respeitando o tempo de crescimento dos isolados e fitopatógenos avaliados (Anexo 1).

Posteriormente foram realizados testes para detecção de metabólitos voláteis e não voláteis, com os isolados endofíticos que apresentaram resultados positivos.

Os discos contendo micélio e/ou conídios, dos isolados endofíticos ou dos fitopatógenos ensaiados foram obtidos de colônias crescidas em BDA, durante sete dias, incubadas em estufa BOD e fotoperíodo de 12 horas. Após este período foram retirados os discos da borda das colônias, com auxílio do vazador de rolhas.

A avaliação para determinar a porcentagem de inibição do crescimento foi obtida medindo-se o diâmetro das colônias, subtraindo-se o diâmetro do disco de micélio inicial (QUIROGA et al., 2001) e calculada de acordo com EDGINTON et al. (1971), pela fórmula:

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

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

Contra as linhagens de *G. citricarpa* PC13/96 e *G. citricarpa* 33/05 foram realizados testes de metabólitos voláteis com placa de Petri com divisória e detecção da atividade antifúngica dos extratos dos isolados endofíticos.

4.5.1.1 Técnica de Cultura Pareada

Em placas de Petri contendo BDA, colocou-se um disco (Ø 6 mm) da cultura do fitopatógeno e no lado oposto, um disco com o isolado 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 7 dias em estufa BOD, com fotoperíodo de 12 h a 28°C. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. O controle recebeu apenas o fitopatógeno, com três repetições. A avaliação foi realizada mediante medição do diâmetro da colônia comparando com o controle e observação das interações entre as colônias.

4.5.1.2 Teste para detecção da produção de metabólitos voláteis

Duas metodologias foram ensaiadas. A primeira consistiu em posicionar placas de Petri uma frente a outra. Após ter vertido meio BDA em cada uma delas, inoculou-se o isolado endofítico a ser avaliado em uma e na outra, o fitopatógeno (ambos na forma de discos de ágar (Ø8 mm) contendo micélio e conídios). As placas foram sobrepostas, vedadas lateralmente com filme de PVC e em seguida, incubadas em estufa BOD a 28°C, durante sete dias. Foi realizado delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. O controle recebeu apenas o fitopatógeno, com três repetições. A avaliação foi realizada mediante medição do diâmetro da colônia comparando com o controle.

Na segunda metodologia, foram utilizadas placas de Petri com divisória, contendo BDA. Nas extremidades da placa, foi inoculado um disco (Ø12 mm) de cultura do fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96 ou *G. citricarpa* 33/05 e no outro, um disco com a cultura do isolado endofítico a ser avaliado, ambos a 1,0 cm da borda, em posições opostas. As placas foram vedadas com

filme de PVC e mantidas em BOD, a 28°C, fotoperíodo de 12 horas. Avaliou-se o potencial de inibição medindo-se o diâmetro das colônias após sete dias de crescimento comparando com o controle, que recebeu apenas o disco do fitopatógeno.

4.5.1.3 Teste para detecção de metabólitos não voláteis

A técnica consistiu em cobrir asépticamente toda a superfície do meio BDA, inclusive nas bordas com discos de papel celofane (Ø11 cm). 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 48 horas ou até atingirem aproximadamente 2/3 de toda a placa, a uma temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 horas. Mediu-se o diâmetro da colônia e retirou-se o papel celofane (juntamente com a colônia do isolado endofítico). Sobre a superfície de meio BDA, inocularam-se dois discos de micélio do fitopatógeno a ser avaliado (a 1,0 cm da borda da placa, em direção oposta). Realizou-se cinco repetições do tratamento e três nas placas controles, que receberam apenas o fitopatógeno. As placas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e aguardou-se 72 horas. Após este período, mediu-se o crescimento das colônias e comparou-se com o controle (Adaptado ETHUR, CEMBRANEL e SILVA, 2001).

4.5.2 Avaliação da ação dos extratos

4.5.2.1 Obtenção dos extratos

Para o processo de fermentação, três discos (\emptyset 6 mm) do isolado endofítico de interesse, foram inoculados em frascos de Erlenmeyer (250 mL), contendo 50,0 mL de caldo extrato de malte. Inoculou-se durante sete dias (110 rpm, 28°C, fotoperíodo de 12 horas).

Após a fermentação, o micélio foi separado do líquido fermentado com filtração em papel Whatman n° 4. Ao volume do filtrado obtido, adicionou-se o mesmo volume de acetato de etila 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, submeteu-se a fase aquosa a mais uma extração com EtOAc, repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. Adicionou-se a 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).

4.5.2.2 Crescimento micelial

Foram obtidos discos (\emptyset 12 mm) de colônias da cultura do fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96 ou *G. citricarpa* 33/05, estes foram inoculados no centro de placas de Petri contendo BDA. A 1,0 cm da borda, em posições opostas,

foram colocados discos de papel filtro esterilizado (\varnothing 5 mm) e sobre estes foram inoculados 10,0 μ 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. Como controle positivo foi utilizado fungicida Derosal[®] (1,0 mg/mL).

Para determinar se os extratos apresentavam atividade fungicida ou fungistática, ao término do experimento, o micélio da extremidade da colônia foi transferido para placas com BDA, sem a presença dos extratos e mantidas a 28°C, em BOD, fotoperíodo de 12 horas, durante cinco dias (Adaptado QUIROGA et al., 2001).

4.5.2.3 Influência na germinação de picnidiósporos e formação do apressório

Foram colocados 10 μ L de suspensões de picnidiósporos do fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96 ou *G. citricarpa* 33/05 (aproximadamente 1×10^4 picnidiósporos/mL de “Tween 80” 0,1%), em placas de Petri de poliestireno, sobre esta suspensão foram adicionados 10 μ L do extrato metanólico. Fragmentos de papel Whatman n° 4 (2,0 cm x 2,0 cm) foram colocados dentro das placas e embebidos em água destilada autoclavada, as placas foram seladas com filme de PVC e mantidas a 28°C, fotoperíodo de 12 horas, em BOD durante 24 e 48 horas. Após este período, a porcentagem de

germinação foi avaliada por meio da observação por microscópio óptico (aumento de 1000 X). Considerou-se como germinados os picnidiósporos com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento do picnidiósporo não germinado. Antes da leitura, em cada placa foram adicionados 10 µL de uma solução para paralisar a germinação dos picnidiósporos (item 4.2.15). Como controle positivo foi utilizado o fungicida Derosal[®] (1,0 mg/mL) e controle negativo apenas água destilada autoclavada.

4.5.2.4 Formação de picnídios de *G. citricarpa* em folhas autoclavadas

Para testar o efeito inibitório dos extratos metanólicos na formação de picnídios, folhas de limão cravo foram coletadas no Campus do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. As folhas foram lavadas em água corrente, cortadas em pequenos fragmentos e autoclavados por 20 minutos em água destilada. Três fragmentos foram colocados em placas de Petri com meio BDA. Discos de micélio (Ø 12 mm) de colônias da cultura do fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96 ou *G. citricarpa* 33/05 foram inoculados em pontos adjacentes a cada fragmento foliar, sobre estes foram adicionados 10 µL do extrato metanólico. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas a 28°C, fotoperíodo de 12 horas, em BOD durante 21 dias. Após este período, os picnídios crescidos sobre os fragmentos foliares foram contados, por observação com lupa. Como controle positivo foi utilizado fungicida Derosal[®] (1,0 mg/mL).

4.5.3 Atividade antibacteriana dos endófitos

4.5.3.1 Obtenção do metabólito

Os isolados endofíticos foram cultivados em BDA durante 7 dias (28°C, fotoperíodo de 12 horas, BOD), após este período, três discos (Ø 6 mm) foram retirados da borda da colônia e inoculados em frascos de Erlenmeyer (100 mL) contendo 10 mL de BD (acrescido de 0,2% de extrato de levedura), incubados por oito dias, 120 rpm, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente à fermentação, separou-se o micélio do líquido fermentado filtrando com papel Whatman n° 4. O líquido novamente foi filtrado em membrana Millipore (0,22 µm ou 0,45 µm) e armazenado a 4°C para realização dos ensaios antibacterianos.

4.5.3.2 Avaliação da ação antibacteriana

Para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados ensaios biológicos qualitativos, em triplicata, utilizando como controle positivo o antibiótico Tetraciclina (0,5 µL/mL de etanol absoluto), pelo método de difusão em disco (*cup plate* e *pour plate*) e difusão com vazador de rolhas (*pour plate*), a partir da obtenção do líquido metabólito dos isolados endofíticos contra microrganismos teste *E. coli* e *S. aureus*.

Para a metodologia *cup plate*, os microrganismos teste, crescidos *overnight* em caldo nutriente, ajustadas a uma concentração de 10⁶ cél/mL em

solução salina, foram inoculados (50 µL) sobre placas de Petri contendo meio MHA, espalhou-se com alça de Drigalsky. Posteriormente colocaram-se discos papel Whatman n° 4 estéreis (Ø 5 mm) inoculados com 10 µL do líquido metabólico. As placas permaneceram incubadas a 37°C durante 24 horas. Avaliou-se a atividade antimicrobiana pela formação do halo de inibição (Adaptado MARIANO,1993; SOUZA, 2004). Para *pour plate*, seguiu a mesma metodologia, porém, foram inoculados 1000 µL em 15 mL de meio MHA fundente, aguardou-se a solidificação e então foram colocados os discos de papel inoculados com líquido metabólico.

Para a segunda metodologia empregada, o método de difusão com vazador de rolhas (*pour plate*), os microrganismos teste crescidos *over-night* em caldo nutriente, ajustados a uma concentração de 10^6 cél/mL com solução salina, foram inoculados (1000 µL) em 15 mL de meio MHA, mantido em banho-maria a aproximadamente 50°C e espalhados em placa de Petri. Aguardou-se a solidificação e com vazador de rolhas esterelizado, fez-se poços (Ø 5 mm), onde foram adicionados 100 µL do líquido metabólico. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Avaliou-se a atividade antimicrobiana pela formação do halo de inibição (Adaptado MARIANO,1993; SOUZA, 2004)

4.5.3.3 Técnica de bioautografia em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) pelo método do agar-overlay

Para o desenvolvimento desta técnica foram utilizados extratos metanólicos dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp., obtidos de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.1.2, testados contra os seguintes microrganismos teste: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *M. luteus* e MARSA.

Um fragmento do meio contendo o microrganismo teste, foi retirado e transferido para um novo tubo contendo 10 mL de caldo MH, homogeneizou-se no agitador de tubos e incubou-se a 37°C por 24 horas. A partir deste inóculo preparou-se uma diluição com 10⁶cél/mL e transferiu-se 100 µL para um novo tubo de ensaio com tampa, contendo 10 mL de caldo MH. Homogeneizou-se com agitador de tubos e incubou-se a 37°C por 48 horas. Neste intervalo, prepararam-se as placas CCD (20 x 20 cm), cortou-se na medida de 6 x 6 cm, estas foram divididas, riscando-as com lápis em quatro quadrados medindo 1,5 cm cada, fez-se também um pequeno corte no canto esquerdo para servir como guia. Colocou-se um quadrado de CCD em cada placa de Petri e autoclavou-se por 20 minutos a 1 atm. Após as 48 horas, aplicou-se 5 e 10 µL de cada amostra do extrato metanólico em cada fileira na placa, reservando a última fileira para aplicação do controle positivo: solução de Tetraciclina (5 mg/mL). Uma alíquota de 100 µL do inóculo foi retirada e transferida para um tubo com tampa contendo 10 mL de Agar MH, (manteve-se aquecido em banho-maria a 58°C, evitando-se

a solidificação do meio ou danos a bactéria), tampou-se o tubo e homogeneizou-se no agitador de tubos durante um minuto. Cobriu-se a placa de CCD com todo o volume do tubo. Aguardou-se com a placa de Petri aberta até a solidificação do meio. A placa foi tampada e incubada a 37°C por 24 horas.

Para visualização da atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos, borrifou-se a placa com solução de MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] (Sigma, M-2128) e incubou-se por um período de uma a duas horas. A atividade foi detectada através da formação do halo de inibição (esbranquiçado) contra um fundo roxo.

4.6 Caracterização morfológica molecular de *Pestalotiopsis* spp.

4.6.1 Obtenção de colônia monospórica

Após serem identificadas como pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* obteve-se colônia monospórica, cultivando o isolado endofítico em placa de Petri com meio BDA e incubou-se a 28°C. Observou-se o crescimento da colônia e monitorou-se com observação em microscopia óptica o aparecimento de esporos. Fragmentos de hifas e esporos foram coletados e macerados em solução de “Tween 80” 0,1%. Despejou-se a suspensão de esporos dentro de seringas contendo lã de vidro, apoiadas em tubos Falcon. Em seguida, adicionou-se mais 10 mL de solução salina. Centrifugou-se a solução filtrada, durante 4 minutos a 7000 rpm (rotações por minuto). Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se

400µL de solução salina para suspender o precipitado onde ficaram contidos os esporos, retirou-se 10 µL desta suspensão e os esporos foram contados na Câmara de Neubauer. Quando necessário, diluiu-se em solução salina. Foram semeados 100 µL de suspensão em uma placa de Petri contendo meio BDA, espalhou-se com alça de Drigalsky, incubou-se a 28°C. O material obtido foi estocado em tubos com BDA inclinado a 4°C.

4.6.2 Técnica de microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999)

Após a obtenção da colônia monospórica, realizou-se a técnica de cultura em lâmina ou técnica de microcultivo para identificação dos isolados endofíticos. Para este procedimento utilizaram-se placas de Petri esterilizadas contendo no seu interior duas lâminas cruzadas e um chumaço de algodão.

Cortou-se o meio BDA com bisturi esterilizado, formando cubos de um centímetro cúbico. Retirou-se um cubo e colocou-se sobre as lâminas. Pequenas quantidades de micélio do isolado endofítico foi retirado do tubo estoque e colocados sobre as extremidades do cubo. Com auxílio da pinça esterilizada colocou-se cuidadosamente a lamínula sobre o cubo. O algodão foi umedecido com água destilada autoclavada com o auxílio de pipeta. Etiquetou-se a placa e incubou-se na estufa a 28°C. Se necessário molhou-se novamente o algodão. A lamínula foi retirada em intervalos de tempos diferentes (7, 14 e 21 dias) e colocada sobre uma lâmina limpa com uma gota de lactofenol azul de algodão ou lactofenol incolor e observou-se no microscópio óptico. Os conídios foram

medidos de acordo com os seguintes critérios: comprimento dos apêndices, comprimento e largura do conídio sem considerar o apêndice basal.

4.6.3 Avaliação da esporulação em diferentes meios de cultura

Discos de micélio (\varnothing 12 mm) provenientes de colônias de *Pestalotiopsis* spp., com 21 dias de crescimento em BDA, foram inoculados no centro de placas de Petri com diferentes meios de cultura: Batata-dextrose-ágar (BDA), aveia-ágar (MAV), extrato de malte-ágar (MEA) e completo (MC). Foram incubados durante 7 dias, a 28°C, fotoperíodo de 12 h. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após este período avaliou-se o diâmetro das colônias.

Para avaliação na taxa de esporulação, foram retirados 3 discos de (\varnothing 5 mm), com auxílio do furador de rolhas, tangencialmente ao centro da colônia formando um triângulo. Os discos contendo micélio e ágar foram colocados em tubos Falcon que continham 2 mL de solução de “Tween” 80 0,1%. Com auxílio do agitador de tubos, a suspensão foi homogeneizada e procedeu-se a contagem de esporos em Câmara de Neubauer.

4.7 Análise da variabilidade genética por RAPD

4.7.1 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). Cultivou-se os isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. em meio BDA durante três dias a 28°C. Coletou-se o micélio, raspando a colônia com material esterilizado e liofilizou-se. O micélio foi macerado com adição de nitrogênio líquido. O material foi pesado e para cada grama de micélio, acrescentou-se 1 mL de Tampão de Extração (TE). Incubou-se a solução homogeneizada durante 20 minutos no banho-maria a 70°C. Na capela, 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 500µL 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. O tubo aberto secou a uma temperatura de 37°C durante 30 minutos. Ressuspendeu-se o DNA com 200 µl de tampão TRIS-EDTA, o material permaneceu durante uma hora sobre a bancada. As amostras foram tratadas RNase (30µg/mL) a 37°C por uma hora.

4.7.2 Quantificação do DNA

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 *Hind* III em com concentração conhecida. Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, observado sobre transiluminador de ultravioleta e fotodocumentado.

4.7.3 Amplificação do DNA – RAPD

Foram testadas as concentrações de DNA e magnésio, os ciclos de amplificação e a seleção de *primers*. Ensaíram-se concentrações de DNA de 25 a 200 ng/reacção e concentrações de magnésio de 3 e 4 mM.

Para a amplificação das amostras, foi utilizada uma mistura conforme descrito na Tabela 1. Foram misturadas quantidades apropriadas de água Milli-Q esterilizada, tampão 10X, MgCl₂, dNTPs, *primer* e Taq Polimerase (Invitrogen), em um único tubo. Foram colocados 20µL dessa solução (para reacções com volume final de 25µL) em cada um dos tubos de microcentrífuga, para a amplificação. Imediatamente após a adição da mistura de reacção, foram

adicionados 5µL das amostras de DNA previamente diluídas em água Milli-Q esterilizada.

Regiões do DNA foram amplificadas em termociclador (Mastercycler gradiente – Eppendorf) programado para realizar reação de 40 ciclos, após desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, constituindo-se de 1 minuto a 92°C, por 1 minutos e 30 segundos a 37°C e 2 minutos a 72°C, com extensão final de 3 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (3 V/cm) em Gel de Agarose 1,5%, utilizando DNA *ladder* de 100pb (Ludwing Biotec) como marcador de peso molecular. O gel de agarose foi corado com solução de brometo de etídio durante 15 minutos. Observou-se em transiluminador de UV (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e fotodocumentou-se (Programa Digi-doc it).

TABELA 1 - COMPONENTES DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Pestalotiopsis* spp. E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS EM UMA REAÇÃO DE RAPD

Componentes	Concentração estoque	Concentração final	Volume da reação (µL)
Água Milli-Q	-	QSP	11,2
Tampão	10 X	1X	2,5
MgCl ₂	50Mm	3,0 mM	1,5
d’NTPs	1,25 Mm	100µM	2,0
Primer	4µM	0,4 µM	2,5
Taq Polimerase (Invitrogen)	5 U/µL	1,5 U	0,3
DNA		50 ng	5,0
Total			25,0

FONTE: O autor

4.7.4 Análise do polimorfismo

Foram elaboradas matrizes e dendrogramas com auxílio do programa NTSYS-PC (“Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs”) (ROHLF, 1988).

As bandas resultantes foram analisadas com base em variáveis binárias, onde 0 indica ausência de banda e 1 presença. Com o software NTSYS, a partir da matriz binária construiu-se uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J). Consideram-se as bandas como variáveis e os isolados, como unidades. Calculou-se o coeficiente segundo a fórmula $J=M/P$, sendo M o número de concordâncias positivas e P, o número total de variáveis, subtraindo-se as concordâncias negativas (SNEATH e SOKAL, 1973). As unidades foram agrupadas através do método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average”), que permite a construção de dendrogramas (SNEATH e SOKAL, 1973).

Para verificação da confiabilidade dos agrupamentos do dendrograma, realizou-se análise *bootstrap* com 500 reamostragens, segundo descrito por FELSENSTEIN (1985), utilizando o software BOOD (COELHO, 2005). Consideram-se os agrupamentos que apresentarem P maior ou igual a 95%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap*.

4.8 Análise estatística

Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 3 ou 5 repetições. As análises de variância foram realizadas em todas as etapas do trabalho, sendo os dados analisados segundo esquema fatorial e transformados em $\log(x+2)$, quando necessário (Apêndice 9 e 11). 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).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

5.1.1. Antagonismo contra fungos fitopatogênicos

5.1.1.1 Técnica de cultura pareada

Os 66 isolados selecionados (Anexo 1), avaliados em cinco repetições pela Técnica de Cultura Pareada contra os três fitopatógenos (*Fusarium* sp. 151-2, *Trichoderma* sp. CNBP2F16 e *G. citricarpa* PC 13/96), foram classificados de acordo com quatro interações: 1) Redução do crescimento do fitopatógeno; 2) Inibição do fitopatógeno por parasitismo; 3) Ausência de inibição de crescimento e 4) Inibição do crescimento do isolado endofítico pelo fitopatógeno. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE ESPINHEIRA SANTA E FITOPATÓGENOS ENSAIADOS EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C

Fitopatógenos	Interação 1	Interação 2	Interação 3	Interação 4
<i>Fusarium</i> sp. 151-2	7,58%	12,12%	66,7%	13,6%
<i>Trichoderma</i> sp. CNBP2F16	-	-	21,21%	78,79%
<i>G. citricarpa</i> PC 13/96	3,03%	54,55%	-	42,42%

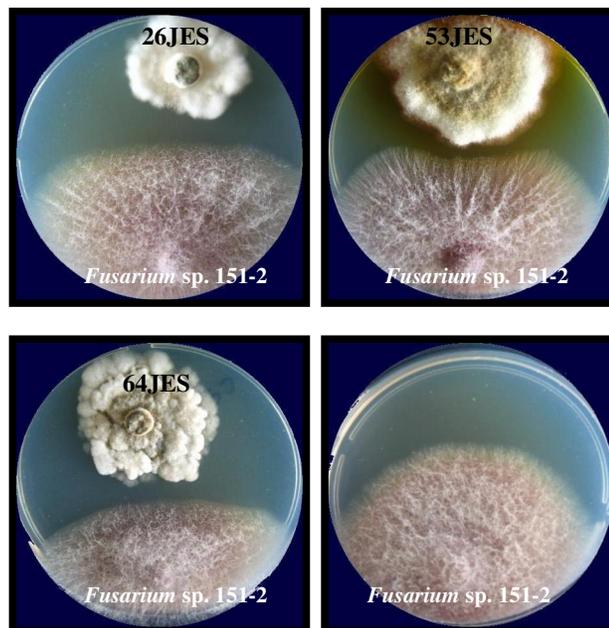
FONTE: O autor

As interações do grupo 2, que apresentavam possível interação por parasitismo foram avaliadas microscopicamente e observou-se sobreposição de hifas entre os isolados endofíticos, sem haver indícios de parasitismo.

Na interação do grupo 1, destacaram-se os isolados 6JES, 10JES, 26JES, 53JES e 64JES contra *Fusarium* sp. 151-2 (Figura 1). De acordo com a

porcentagem de inibição o isolado 64JES demonstrou maior inibição do crescimento da colônia em relação ao controle (Figura 2). A análise estatística demonstra que há diferença significativa entre o controle e as isolados avaliados, mas estes não diferem entre si (Anexo 2).

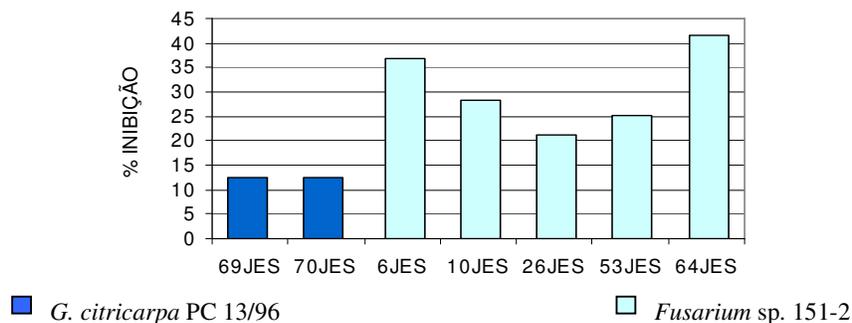
FIGURA 1 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE 3 ISOLADOS ENDOFÍTICOS CONTRA O FITOPATÓGENO *Fusarium* sp. 151-2 EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



FONTE: O autor

Os isolados 69JES e 70JES inibiram o crescimento do fitopatógeno *G. citricarpa* PC 13/96 com porcentagem de inibição de 12,59% (Figura 2), porém na análise estatística não houve diferença significativa (Anexo 3).

FIGURA 2 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DA COLÔNIA DOS FITOPATÓGENOS *G. citricarpa* PC 13/96 E *Fusarium* sp. 151-2 PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS, EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



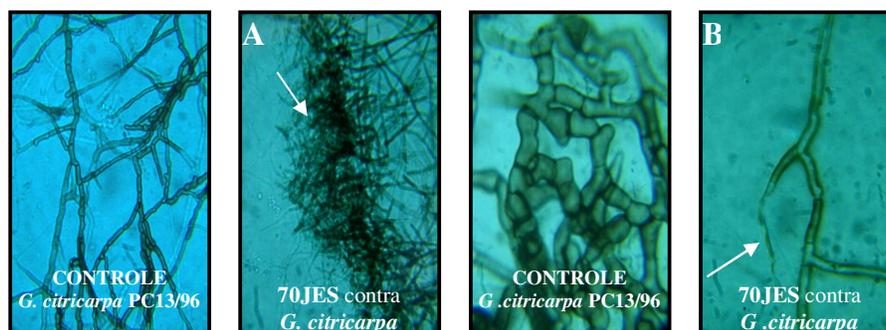
FONTE: O autor

No estudo da interação das hifas, entre os isolados 69JES e 70JES contra o fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96, observou-se a formação de uma barreira com sobreposição e degradação das hifas do fitopatógeno (Figura 3).

Conforme os dados da Tabela 2, não foram encontradas interações do tipo 1 e 2 contra o fitopatógeno *Trichoderma* sp. CNBP2F16. Ao contrário, observou-se que este crescia rapidamente e poucos dias após sua inoculação, havia a sobreposição das colônias do fitopatógeno sobre os isolados endofíticos (Figura 4). Este comportamento agressivo e capacidade de competição, pela rápida colonização do substrato pelo gênero *Trichoderma*, foi também descrito por MELO e AZEVEDO (1998).

Na Figura 4, observa-se a formação de uma barreira de coloração mais escura ao longo da linha de contato entre as colônias, comportamento semelhante foi citado por ETHUR, CEMBRANEL e SILVA (2001), entre espécies de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum*.

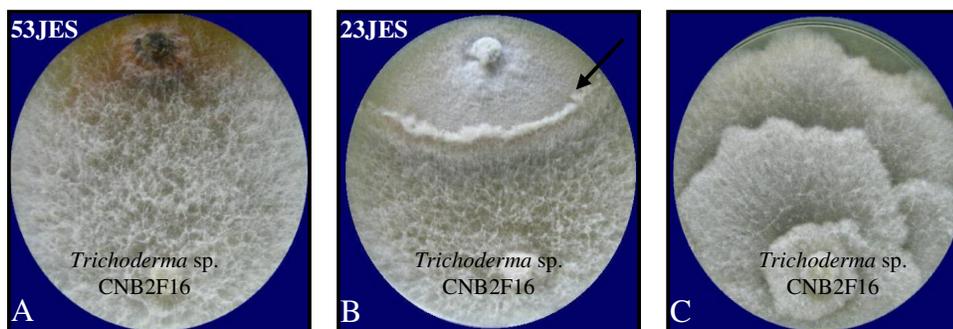
FIGURA 3 - ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS HIFAS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96 APÓS EXPOSIÇÃO AO ISOLADO ENDOFÍTICO 70JES, APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO, EM MEIO BDA A 28°C



FONTE: O autor

NOTA: **A.** Formação de barreira (aumento de 400X); **B.** Degradação de hifas (aumento de 1000X); (coradas com lactofenol azul de algodão)

FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 53JES E 23JES CONTRA O FITOPATÓGENO *Trichoderma* sp. CNB2F16 PELA TÉCNICA DE CULTURA PAREADA EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



FONTE: O autor

NOTA: **A:** Crescimento rápido e sobreposição de hifas no isolado 53JES; **B:** Formação de barreira visualizado pela junção entre as colônias (indicado por seta); **C:** Controle: Fitopatógeno *Trichoderma* sp. CNB2F16.

5.1.1.2 Teste para detecção de metabólitos voláteis

Os dados da Tabela 3 demonstraram que os isolados 70JES (26,9%), 26JES e 64JES (12,16%), foram os que apresentaram uma inibição significativa

do crescimento da colônia de *G. citricarpa* e *Fusarium* sp. 151-2, porém, estes resultados, quando analisados pelo teste de Tukey, não apresentaram diferença significativa para nenhum dos fitopatógenos avaliados (Anexo 4).

Na avaliação da produção de metabólitos voláteis onde foram ensaiados 63 isolados endofíticos (Anexo 5) e utilizando-se a fórmula proposta por EDGINTON et al. (1971), 4 isolados apresentaram percentagem de inibição superior a 25%: (9JAES, 12JAES, 5JES e 9JES) contra o fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96 e 12 isolados (3JAES; 4JAES; 5JAES; 25JES; 29JES; 36JES; 49JES; 61JES; 74JES; PAC 27; FAC 27 e SD07ES) contra *G. citricarpa* 33/05. Tal inibição ocorreu devido a ação fungistática. Sugere-se a realização de novos testes para avaliação da ação dos metabólitos secundários, investigando a inibição do crescimento micelial e formação de esporos.

TABELA 3 – PORCENTAGEM MÉDIA DE INIBIÇÃO DE DIÂMETRO DE COLÔNIAS DOS FITOPATÓGENOS *G. citricarpa* PC13/96 e *Fusarium* sp.151-2 PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS, EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C

Isolados	<i>G. citricarpa</i> PC13/96 (%)	<i>Fusarium</i> sp.151-2 (%)
69JES	10,15	-
70JES	26,90	-
6JES	-	9,45
10JES	-	10,81
26JES	-	12,16
53JES	-	5,40
64JES	-	12,16

FONTE: O autor

NOTA:(-) indica ausência de inibição

5.1.1.3 Teste para detecção de metabólitos não voláteis

Metabólitos voláteis e não voláteis produziram efeitos diferentes, no teste de metabólitos não voláteis verificou-se inibição significativa (Anexo 6) no crescimento dos fitopatógenos *G. citricarpa* PC13/96 (Figura 5B) e *Fusarium* sp. 151-2 (Figura 5A).

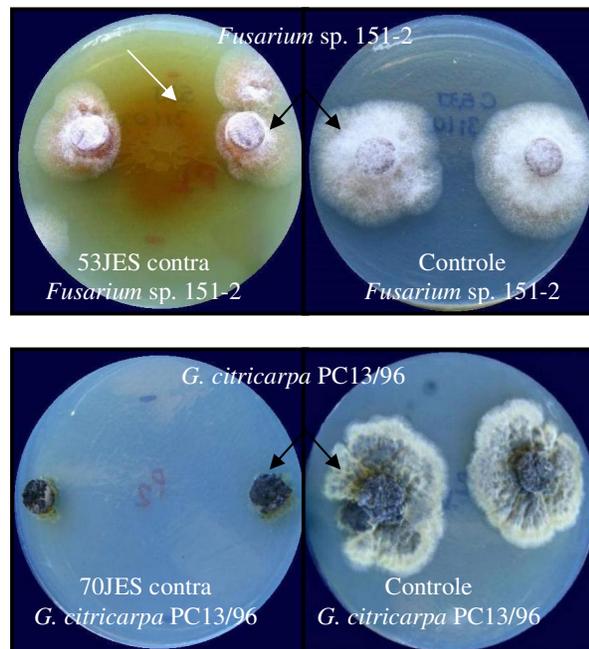
Os resultados apresentados contra *G. citricarpa* PC13/96 (Figura 5B), com redução significativa do crescimento micelial (Anexo 6), aliados aos obtidos por meio de microscopia (Figura 3), sugerem que a interação entre os isolados endofíticos e o fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96, ocorreu via produção de metabólitos não voláteis.

De acordo com os resultados apresentados pelos isolados endofíticos 69JES e 70JES contra o fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96, tornou-se necessário a realização de testes que avaliassem melhor a interação entre os endófitos e fitopatógeno. Sendo assim, o teste de metabólitos não voláteis foi feito, utilizando-se também o fitopatógeno *G. citricarpa* 33/05 e um isolado endofítico escolhido ao acaso, dentro dos 66 endófitos que haviam sido isolados, para verificar se a inibição do crescimento não estava ocorrendo simplesmente pela diminuição dos nutrientes no meio de cultura, uma vez que o fitopatógeno foi inoculado sete dias após o início do experimento.

No novo ensaio, verificou-se que tanto o isolado endofítico 69JES quanto o 70JES inibem igualmente os fitopatógenos, havendo confirmação de

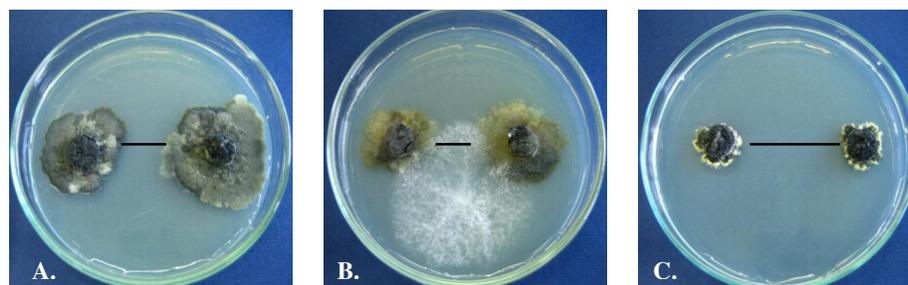
significância também pelo teste de Tukey (Anexo 7). Nas placas com o isolado endofítico 78JES, houve diminuição no crescimento dos fitopatógenos em relação ao controle, mas diferiu significativamente em relação ao crescimento observado nas interações com os isolados endofíticos 69JES e 70JES.

FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FITOPATÓGENOS *Fusarium* sp. 151-2 E *G. citricarpa* PC13/96 POR METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 53JES E 70JES EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



FONTE: O autor

FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* 33/05, INOCULADAS APÓS RETIRADA DO PAPEL CELOFANE PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



FONTE: O autor

NOTA: **A:** Placa controle com fitopatógeno *G. citricarpa* 33/05, sem a prévia inoculação de isolado endofítico. **B:** Placa com o fitopatógeno *G. citricarpa* 33/05 inoculado após retirada do celofane onde antes havia o celofane com o isolado 78JES, apresentando crescimento de hifas do mesmo. **C:** Placa com o fitopatógeno *G. citricarpa* 33/05, onde antes havia o celofane e o isolado endofítico 70JES (As linhas indicam a diferença na distância entre as colônias)

5.1.1.4 Avaliação da ação dos extratos

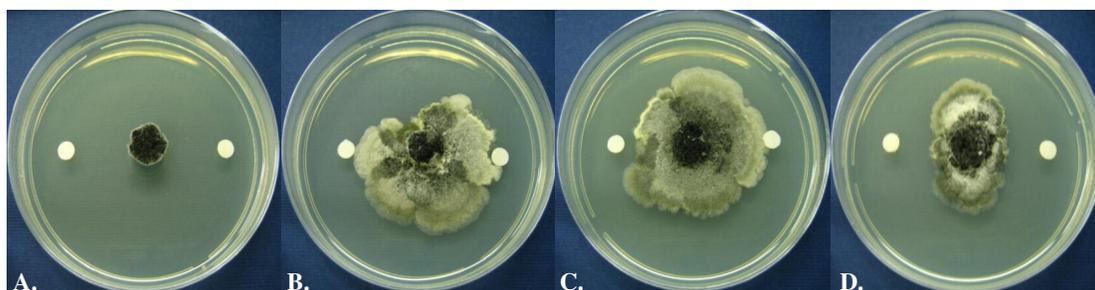
Os isolados endofíticos 69JES e 70JES foram ainda avaliados quanto à ação dos extratos metanólicos contra os fitopatógenos de *G. citricarpa* PC13/96 e *G. citricarpa* 33/05.

5.1.1.4.1 Influência do crescimento micelial

Os resultados apresentados no Anexo 8 indicam que o extrato metanólico produzido a partir dos isolados endofíticos 70JES e 69JES reduziram significativamente o crescimento micelial de ambas as linhagens do fitopatógeno da MPC. A inibição ocorreu devido aos metabólitos secundários produzidos pelos isolados endofíticos, uma vez que com metanol (onde o extrato foi diluído) o crescimento micelial não diferiu significativamente do controle (onde foi

utilizado somente água destilada) (Figura 7 e Anexo 8). Também houve diferença significativa entre os isolados endofíticos, demonstrando que o isolado 70JES é mais efetivo no controle do crescimento micelial em relação ao isolado 69JES (Anexo 8).

FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* 33/05 EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



A. Placa controle com fungicida Derosol[®] (1,0 mg/mL); B. Placa controle com água destilada autoclavada; C. Placa controle com metanol; D. Placa com extrato metanólico do isolado endofítico 70JES.

5.1.1.4.2 Influência na germinação de picnidiósporos e formação do apressório

Não foi possível observar a germinação de picnidiósporos e formação do apressório como os observados por CARDOSO-FILHO (2003), que utilizou os extratos de albedo. A técnica foi repetida duas vezes, com tempos de germinações diferenciadas. Em todas as repetições e todos os tratamentos, observou-se a presença dos conídios, mas sem germinação.

5.1.1.4.3 Formação de picnídios de *G. citricarpa* em folhas autoclavadas

Os extratos metanólicos dos isolados endofíticos 69JES e 70JES diminuíram significativamente (Anexo 9) o número de picnídios produzidos pelo fitopatógeno *G. citricarpa* PC13/96 e 33/05, na superfície das folhas de citros autoclavadas (Figura 8).

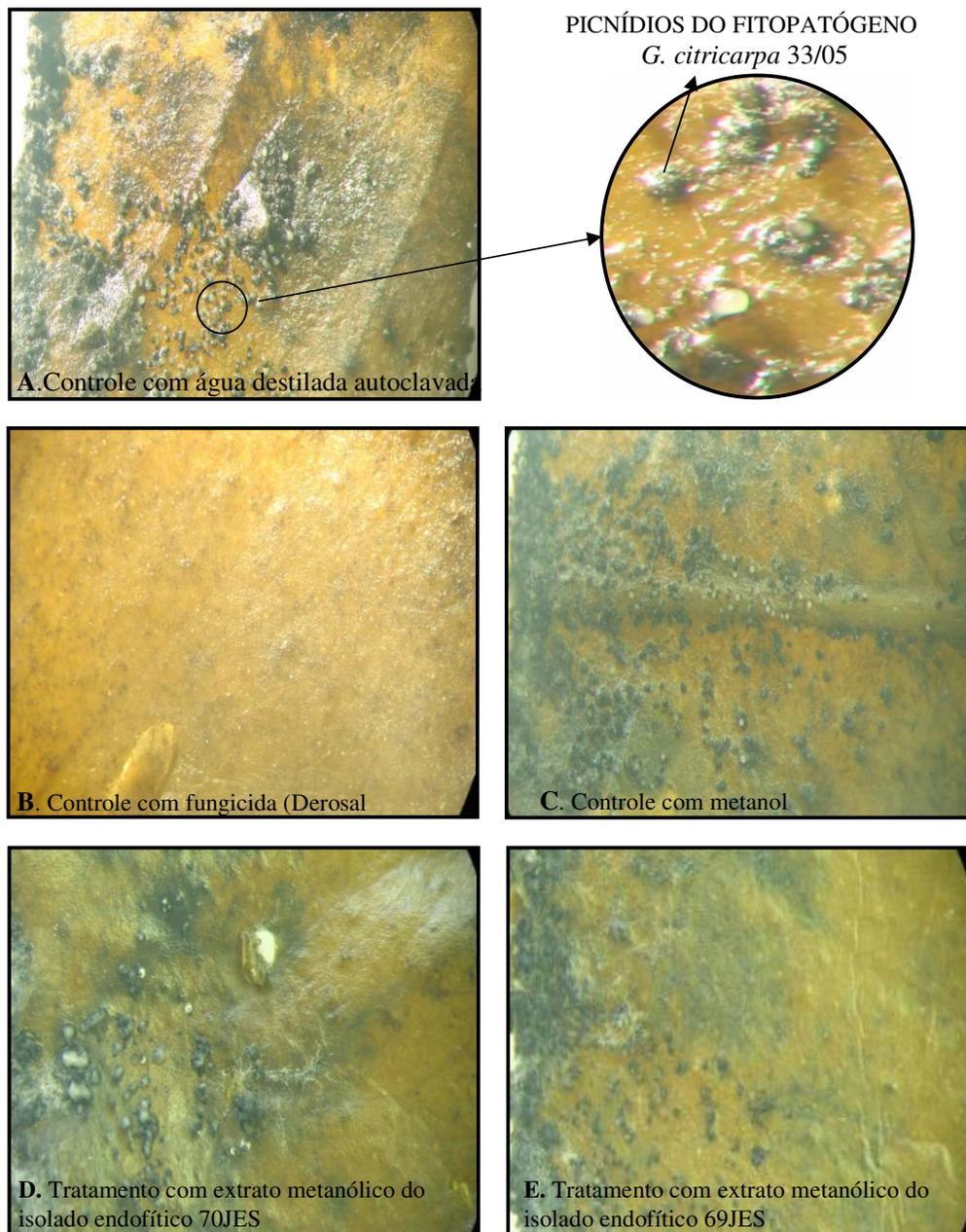
Novamente avaliou-se o efeito do metanol, e este não diferiu do controle onde foi inoculado água, comprovando que a ação está relacionada à produção de metabólitos liberados pelos isolados endofíticos.

Apesar da redução significativa na formação dos picnídios, os resultados foram inferiores quando comparados ao fungicida Derisol® (1,0 mg/mL), utilizado como controle positivo (Figura 8B).

Os extratos metanólicos dos isolados endofíticos 69JES e 70JES não inibiram 100% a formação de picnídios em folhas autoclavadas, mas apresentaram resultados significativos (Anexo 9), havendo também diferença significativa entre eles. Evidenciando ser o isolado 70JES, mais efetivo em relação à 69JES. Entretanto, a redução significativa causada pelos extratos metanólicos dos isolados endofíticos, apresentaram-se promissores, uma vez que a produção de picnídios nas lesões de MPC nos frutos cítricos é a característica principal para declarar a existência de frutos com sintomas na amostra analisada. Como a presença de pelo menos uma lesão de MPC em frutos da amostragem causa a recusa na importação pela Comunidade Econômica Européia, estratégias que minimizem o aparecimento de picnídios de *G. citricarpa* em frutos cítricos,

são de fundamental importância e representam um avanço nas pesquisas de controle desenvolvida

FIGURA 8 - EFEITO DOS EXTRATOS DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS SOBRE A FORMAÇÃO DE PICNIDIÓSPOROS DO FITOPATÓGENO *G. citricarpa* 33/05 EM FOLHAS AUTOCLAVADAS COLOCADAS SOBRE MEIO BDA, APÓS 21 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



FONTE: O autor

5.1.2 Atividade antibacteriana dos endófitos

5.1.2.1 Avaliação da ação antibacteriana dos extratos

Tanto pelo método de difusão em discos como pelo método de difusão com vazador de rolhas não foi possível determinar a atividade antibacteriana de nenhum dos líquidos metabólicos, obtidos dos 66 isolados endofíticos de espinheira santa, como os encontrados por SOUZA et al. (2004) com plantas tóxicas da Amazônia.

De acordo com os resultados obtidos em ambos os métodos, confrontados com a literatura proposta (SOUZA et al., 2004), acredita-se que as condições de cultivo como o tempo de incubação, meio de cultura, pH ou a temperatura, poderiam não ser adequados para a liberação dos metabólitos extracelulares no líquido metabólito, impedindo a detecção de isolados endofíticos com atividade antibacteriana.

Sugere-se que as metodologias sejam novamente ensaiadas, otimizando as condições de cultivo para produção dos metabólitos e utilização de inóculo com diferentes concentrações bacterianas. Com a finalidade de descartar a possibilidade dos resultados negativos, serem decorrentes da ausência de metabólitos secundários no líquido ou de um inóculo demasiado concentrado.

5.1.2.2 Bioautografia em placas de cromatografia em camada delgada pelo método Agar-overlay

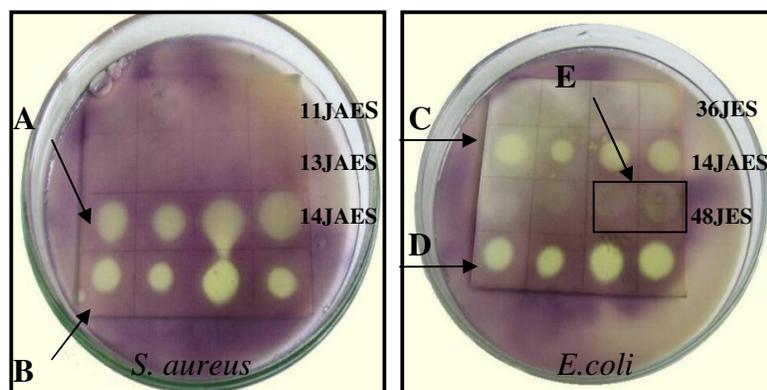
Muitos autores destacam a importância do gênero *Pestalotiopsis* como um grupo de fungo endofítico com papel biotecnológico relevante na produção de metabólitos secundários (LEE, 1996; STROBEL, 1996; 1997; 2000; LI et al., 2001).

Devido à sua importância, este trabalho contemplou um estudo inicial de metabólitos secundários produzidos por 13 isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp.. O potencial antimicrobiano dos isolados foi avaliado de acordo com a técnica de bioautografia em placas de cromatografia de camada delgada pelo método *agar-overlay* (Figura 9).

A Figura 9 mostra a atividade antimicrobiana produzida por 14JES (indicado por seta) e traços de inibição de 48JES. A produção de metabólitos *in vitro* de isolados de *Pestalotiopsis* spp. (Tabela 4) aponta o isolado 14JAES efetivo na atividade inibitória contra MARS, *K. pneumoniae*, *M. luteus*, *S. aureus* e *E. coli*, enquanto o isolado 29SES apresentou os mesmos resultados, com exceção para *K. pneumoniae*. Nenhum dos extratos apresentou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

Os resultados da técnica são apenas qualitativos, mas capazes de demonstrar o potencial antimicrobiano dos extratos conferindo a necessidade posterior de investigar e elucidar a estrutura química dos metabólitos secundários que conferem a atividade antibacteriana destes dois isolados endofíticos, que podem representar, no futuro, novos agentes terapêuticos.

FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA EM CCD *agar-overlay*



FONTE: O autor

NOTA: **A.** Atividade antibacteriana do extrato metanólico do isolado endofítico de *Pestalotiopsis* spp. 14JES contra *S. aureus* (indicado pela seta) em relação ao controle positivo **B**; **C.** Atividade antibacteriana de 14JES contra *E. coli* (indicado pela seta) em relação ao controle positivo **D**; **E.** Traços de inibição promovidos pelo extrato metanólico do isolado endofítico de *Pestalotiopsis* spp. 48JES.

TABELA 4 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PRODUZIDA POR EXTRATOS DE *Pestalotiopsis* spp. DETECTADO PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA EM CCD *agar-overlay*

Extratos	<i>E. faecalis</i>		MRSA		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>M. luteus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	5µl	10 µl	5µl	10 µl	5µl	10 µl	5µl	10 µl	5µl	10 µl	5µl	10 µl	5µl	10 µl
06JAES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09JAES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10JAES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Tr	Tr	0	0
11JAES	0	0	0	0	0	0	0	0	Tr	Tr	0	0	0	0
13JAES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14JAES	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+
29SES	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	Tr	Tr
36JES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48JES	0	0	Tr	Tr	0	0	0	0	0	0	0	0	Tr	Tr
75SES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SD01ES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SD07ES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SV12ES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FONTE: O autor

NOTA: O : não há inibição; Tr: traços de inibição; + zona de inibição de 4 – 5 mm de diâmetro.

5.2 Caracterização morfológica e molecular de *Pestalotiopsis* spp.

Do total de 66 isolados endofíticos avaliados, 13 apresentaram estruturas globulosas de coloração escura sobre o micélio. A partir da análise em microscopia óptica e de acordo com a chave de classificação proposta por JEEWON et al. (2002), os isolados endofíticos foram identificados (Anexo1), como pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis*.

Devido ao grande destaque, nos últimos anos em relação à produção de metabólitos secundários e inexistência de marcadores morfológicos e moleculares para identificação deste gênero, os isolados foram selecionados para uma análise mais aprofundada em relação à sua caracterização morfológica e molecular.

5.5.1 Caracterização morfológica de *Pestalotiopsis* spp.

O aspecto macromorfológico das colônias dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. foram examinados de acordo com o crescimento micelial, forma dos bordos, aspecto e coloração da colônia, em diferentes meios de cultura (Figura 10 e Anexo 1).

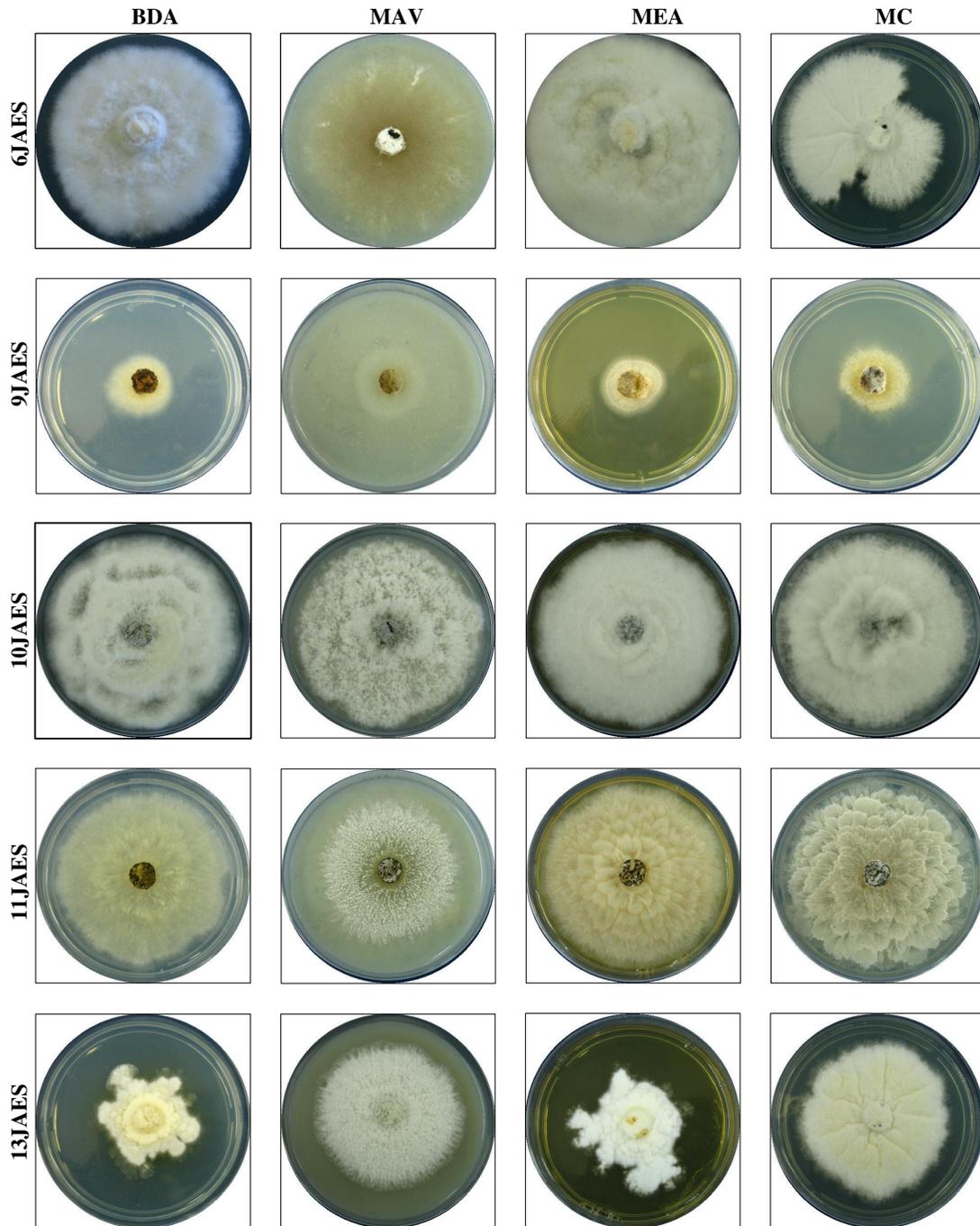
Os isolados endofíticos 9JAES e 48JES, apresentaram crescimento micelial menor que os demais isolados. Em relação aos bordos da colônia, os isolados endofíticos 13JAES e 48JES apresentaram aspecto disforme em meio BDA e MEA, quando comparado com os outros isolados (Figura 10).

Observou-se variação intra-individual na morfologia micelial quando se utilizou diferentes meios de cultura. O micélio variou de ralo a cotonoso, conforme observado no isolado 6JAES, que em meio BDA e MEA o micélio apresentou-se cotonoso, e ralo em MAV e MC.

Os isolados endofíticos 75SES e SV12ES apresentaram coloração que variou do preto, no centro da colônia, para amarelada nas extremidades, causada principalmente pela quantidade de acérvulos, mantendo este padrão em todos os meios ensaiados. Verificou-se que os isolados endofíticos 13JAES (BDA e MC), 14JAES (BDA), 29SES (MEA) e 48JES (MEA) apresentaram coloração amarelada, diferindo de 6JAES, 10JAES, 36JES e SD01ES, que apresentaram coloração branca, em todos os meios avaliados. A coloração esverdeada do isolado endofítico SD07ES nos meios BDA e MEA diferiram dos demais.

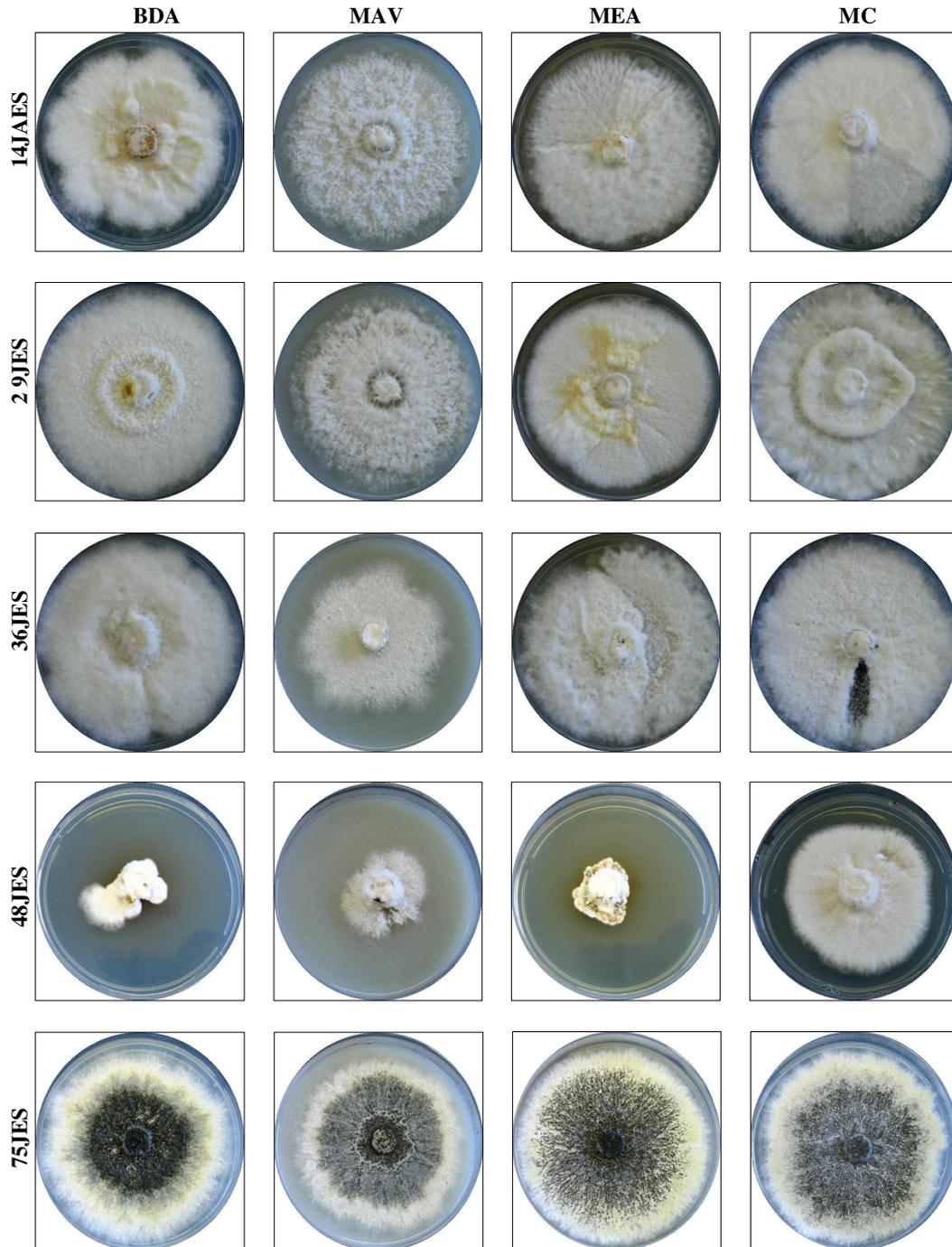
A observação do reverso das placas, contendo as colônias dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. revelou que o isolado 48JES apresentou coloração marrom clara, no centro, tornando-se mais clara nas extremidades, nos quatro meios ensaiados. Os isolados 75SES, SD01ES e SV12ES apresentaram coloração amarelada com pontos pretos. Em contra partida, os demais isolados endofíticos apresentaram no reverso, coloração amarelada, para todos os meios.

FIGURA 10 - MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. EM MEIO BDA, MAV, MEA E MC, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



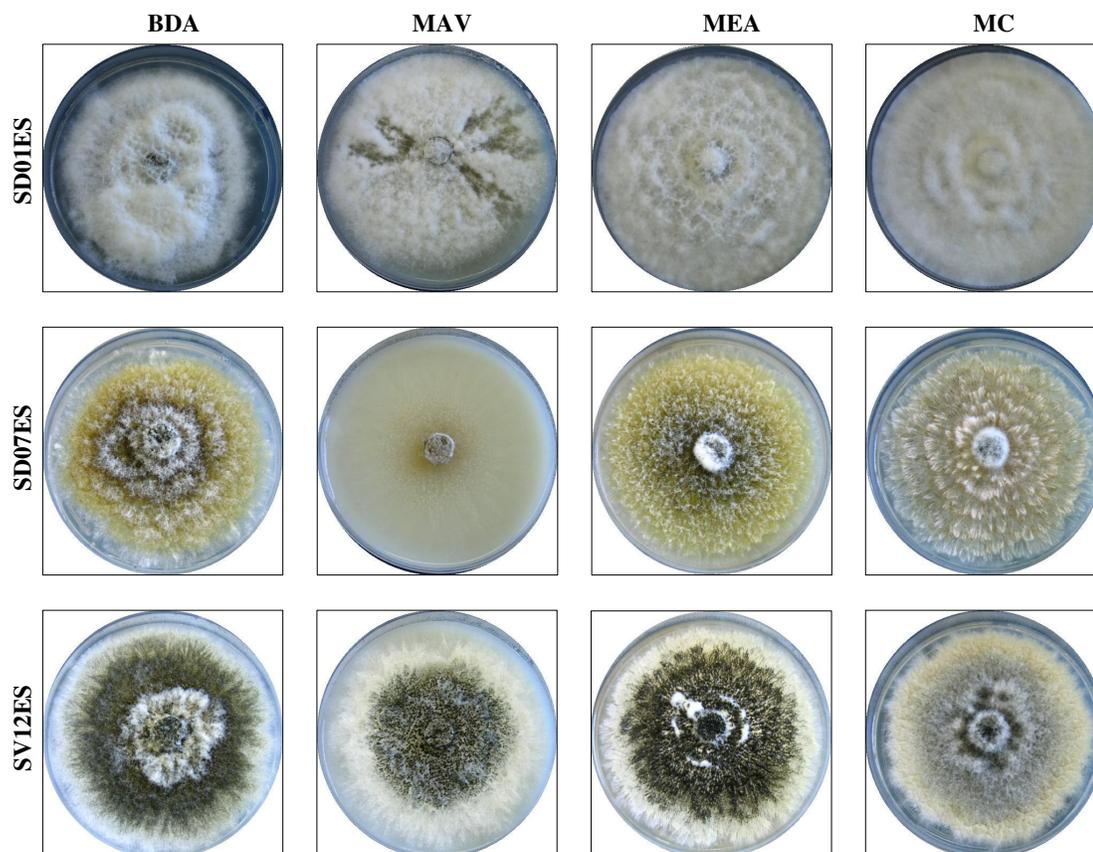
FONTE: O autor

FIGURA 10 - MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. EM MEIO BDA, MAV, MEA E MC, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C (CONTINUAÇÃO)



FONTE: O autor

FIGURA 10 - MACROMORFOLOGIA DE COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. EM MEIO BDA, MAV, MEA E MC, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C (CONTINUAÇÃO)

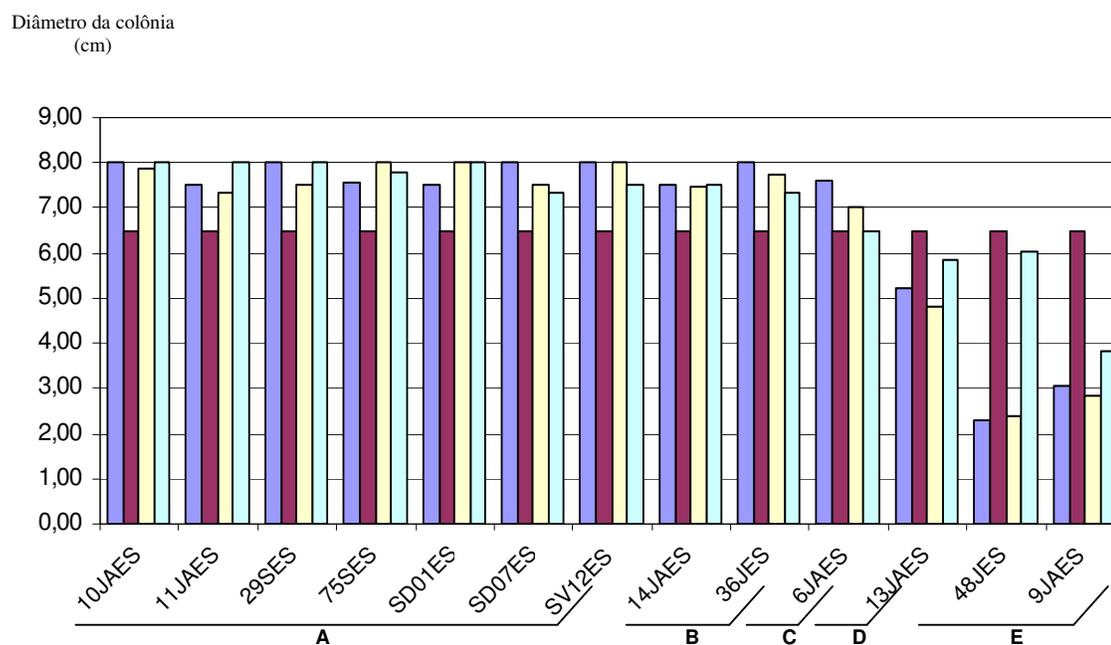


FONTE: O autor

Na avaliação do diâmetro das colônias, houve diferença significativa entre os isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. e entre os meios de cultura ensaiados (Anexo 10). Na Figura 11 observou-se os resultados do diâmetro médio das culturas dos isolados endofíticos após 7 dias de crescimento, que foram agrupados em três grupos distintos: **A** (10JAES, 11JAES, 29SES, 75JES, SD01, SD07 e SV12); **B** (14JES e 36JES); **C** (6JAES) ; **D** (13JES) e **E** (9JES e

48JES). Porém, estes grupos não permaneceriam se o critério utilizado fosse a coloração do micélio, conforme relatado anteriormente.

FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DO DIÂMETRO DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. EM MEIO BDA, MAV, MEA E MC, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO, A 28 °C



FONTE: O autor

ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.

■ BDA

■ MAV

■ MEA

■ MC

NOTA: A, B, C, D e E indicam os diferentes agrupamentos formados em relação ao diâmetro médio das colônias dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp.

Diferentemente dos estudos de HOPIKINS e McQUILKEN (2000), com espécies de *Pestalotiopsis* associados às plantas ornamentais do Reino Unido, não foram avaliados os efeitos da temperatura, do pH e do potencial osmótico.

HOPIKINS e McQUILKEN (2000); YASUDA, KOBAYASHI e IZADA (2003) e KEITH, MAILE e ZEE (2006) sugerem entre 25 a 28°C a

temperatura ideal para o crescimento de *Pestalotiopsis*. No presente trabalho, a variação de temperatura não foi avaliada, permanecendo sempre em torno de 28°C. Em relação à avaliação do pH, pareceu não ser necessário, uma vez que o trabalho foi ensaiado com pH 5,8. De acordo com HOPIKINS e McQUILKEN (2000), o melhor crescimento no diâmetro das colônias de *Pestalotiopsis* ocorreu em meio com pH entre 5,6 e 6,5.

Quando as taxas de esporulação dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. foram avaliados (Anexo 11), tornou-se possível propor a formação de um novo agrupamento (Figura 12), que diferiu do formado anteriormente com os dados obtidos a partir do diâmetro de crescimento das colônias (Figura 11).

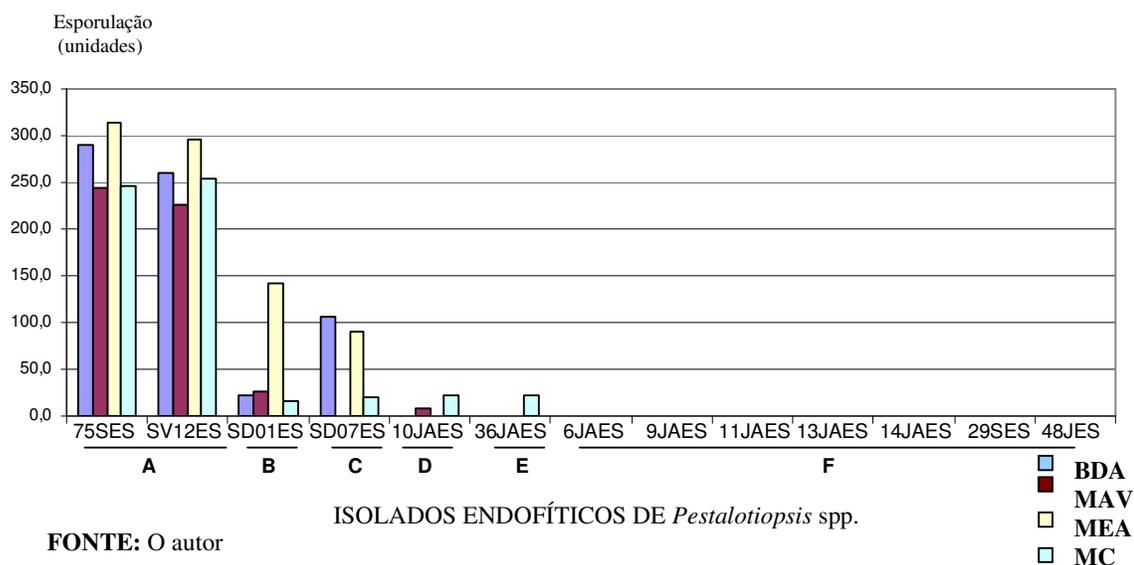
De acordo com a análise estatística (Anexo 11), houve diferença significativa entre a taxa de esporulação dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. e também entre os meios de cultura ensaiados. Estes dados confirmaram as observações macroscópicas da Figura 10, onde os isolados 75SES e SV12ES apresentaram colônias de coloração escura em função da alta produção de acérvulos.

A diferença na taxa de esporulação entre os meios foi observada entre os isolados endofíticos SD01ES e SD07ES, no primeiro houve formação de esporos no meio de aveia, não ocorrendo o mesmo com o segundo. Sugere-se a realização de um novo experimento, para avaliar a taxa de esporulação dos isolados, realizando observações que contemplem intervalos de tempo diferentes (7, 14 e 21 dias), intensidade luminosa diferenciada e variação de pH.

Convém salientar que os isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. 75SES, SD07ES e SV12ES apresentaram esporulação prematuramente em relação aos demais e as estruturas de reprodução foram observadas sobre o micélio, muitas vezes com aspecto viscoso em função da grande quantidade produzida.

Apesar de não apresentarem estruturas visíveis sobre o micélio branco e cotonoso (como os visualizados pelos isolados citados acima), observou-se a esporulação dos isolados 10JAES, 36JAES e SD01ES (Figura 12). Isto se deve ao fato de que, em alguns isolados só foi possível encontrar as estruturas de reprodução assexuada sob o micélio.

FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE ESPORULAÇÃO ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28 °C



NOTA: A, B, C, D, E e F indicam os diferentes agrupamentos formados em relação à taxa de esporulação

KEITH, MAILE e ZEE (2006) detectaram diferenças na produção de acérvulos entre espécies de *Pestalotiopsis* em meio BDA e também na coloração das colônias. HOPIKINS e McQUILKEN (2000), avaliaram diferentes meios de cultura e agruparam espécies de *Pestalotiopsis* destacando a diferença na coloração do meio, produção e coloração de acérvulos.

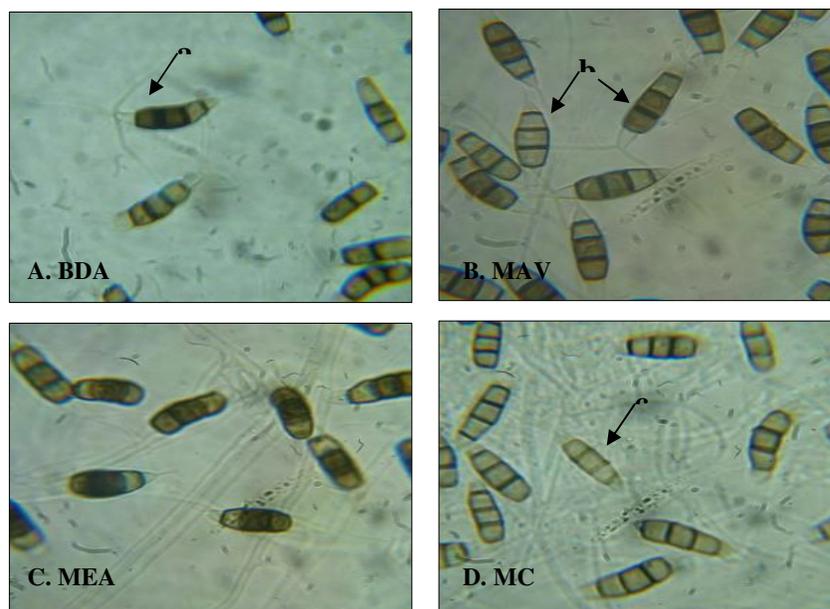
YASUDA, KOBAYASHI e IZADA (2003) estabeleceram a formação de 3 grupos de isolados de *Pestalotiopsis* de acordo com a coloração de colônia, mas destacaram não ser possível identificar as espécies utilizando tais características.

Na análise da micromorfologia observou-se que os conídios dos 13 isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. apresentaram cinco células, sendo uma apical e outra basal, de coloração hialina e as três células medianas variaram a sua coloração. Alguns conídios apresentavam as duas células superiores marrom escuro e a inferior marrom claro, ou coloração uniforme das células medianas (Figura 13a e 13b - apontado pelas setas).

Apesar de critérios de coloração dos conídios serem utilizados na identificação de espécies de *Pestalotiopsis* (JEEWON et al., 2003), percebeu-se diferença na coloração das células medianas. Na Figura 13b, destaca-se a diferença entre dois conídios, um deles apresentou a coloração uniforme, enquanto o outro apresentou apenas as duas primeiras células medianas marrom escuro. Estas diferenças ficaram mais evidentes quando os conídios foram observados em diferentes meios de cultura.

De acordo com a Figura 13c, conídios provenientes de meio completo, apresentaram coloração mais uniforme, a pigmentação escura concentra-se apenas nas paredes das células medianas. Este fato, também foi observado entre os isolados endofíticos 6JAES, 10JAES, 13JES, 14JES, 36JES, 75SES e SD01ES. A diferença de coloração dos conídios, contrariou os estudos propostos por JEEWON et al. (2003) que por meio de identificação molecular, propuseram o estabelecimento de dois grupos, um com coloração variada das células medianas e outro apenas com espécies com coloração uniforme. Sugere-se que, fatores como diferença nutricional dos meios de cultura e grau de maturidade dos conídios, devem ser considerados para este gênero.

FIGURA 13 - MICROMORFOLOGIA DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. SV12ES EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



FONTE : O autor

NOTA: A. Meio BDA; B. MAV; C. Meio MEA e D. MC; a e b. Coloração das células medianas; b. Diferença na coloração das células medianas em MAV; c. Coloração das células medianas uniformes com paredes celulares escuras, em MC

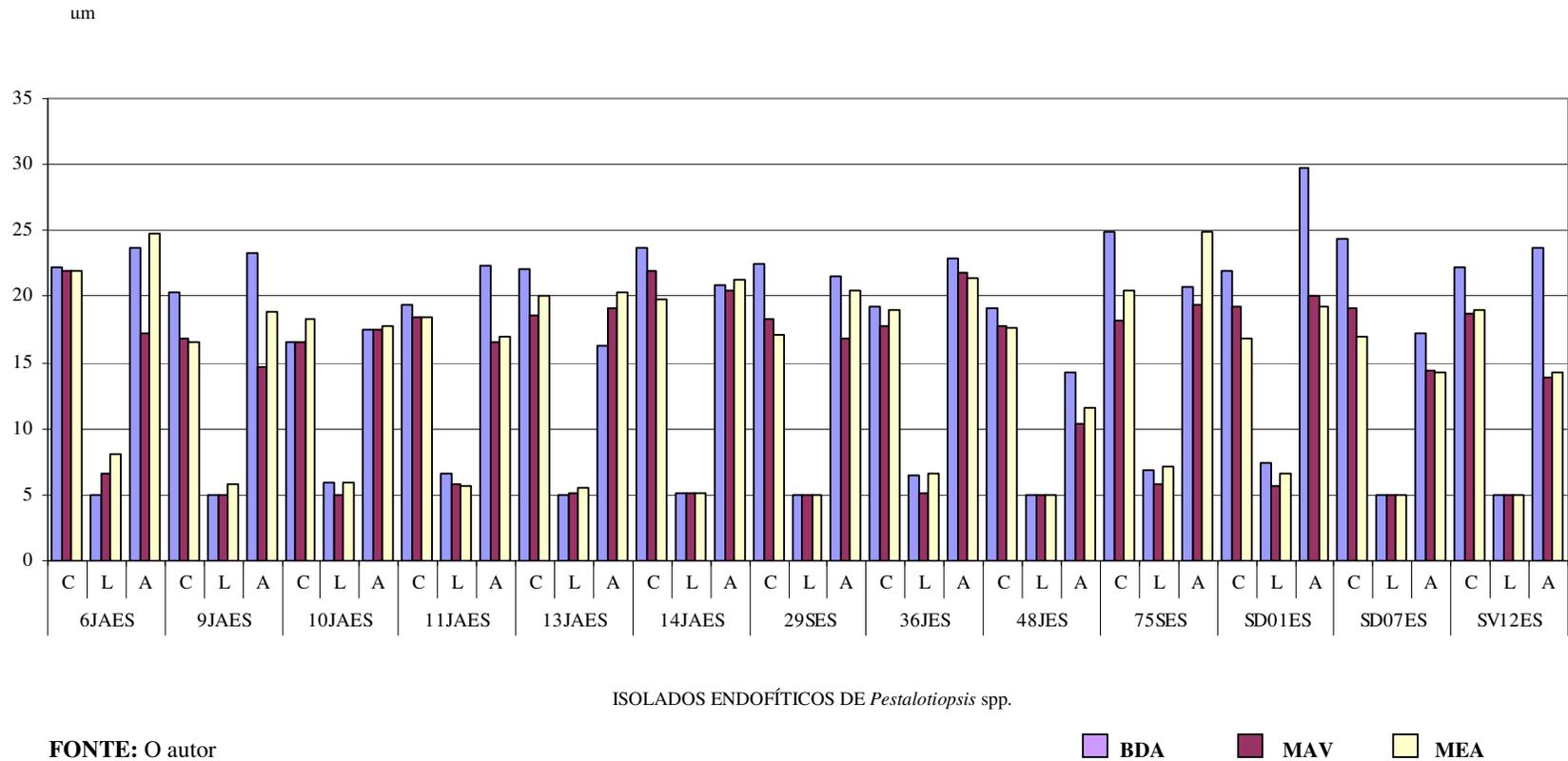
NAG (1993) destacou que existe diversidade na forma e tamanho quando em condições artificiais e sugere cautela na descrição das espécies. Segundo o autor, forma e tamanho podem alterar significativamente com variação do meio em que se encontram as espécies, bem como a posição, o número de apêndices e o número de septos conidiais.

O mesmo verificou-se na Figura 13, onde destaca-se a variação existente na morfologia dos conídios do isolado endofítico SV12ES. Em meio BDA e MEA, os conídios apresentaram-se curvos, porém no meio MAV, apresentaram-se com forma retilínea.

Os conídios foram medidos no comprimento, na largura e no comprimento dos apêndices, com diferença significativa entre os isolados (Anexo 12). A Figura 15 apresenta as diferenças observadas no comprimento dos apêndices, quando diferentes meios de cultura são ensaiados. Em meio BDA, o isolado endofítico SD07ES apresentou apêndices maiores, entre os demais isolados.

Em geral, observou-se que o meio BDA o tamanho dos conídios dos isolados foram maiores do que os demais meios de cultura ensaiados (Figura 16). Este meio de cultura foi descrito por muitos autores como o ideal para identificação das espécies de *Pestalotiopsis* (HOPIKINS e McQUILKEN, 2000; CAMILLI, CARBONARI e SOUZA, 2002; YASUDA, KOBAYASHI e IZADA, 2003; ROSA e CAVALCANTI, 2005; KEITH, MAILE e ZEE, 2006).

FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE MEDIDAS DO COMPRIMENTO E LARGURA DOS CONÍDIOS E COMPRIMENTO DOS APÊNDICES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C

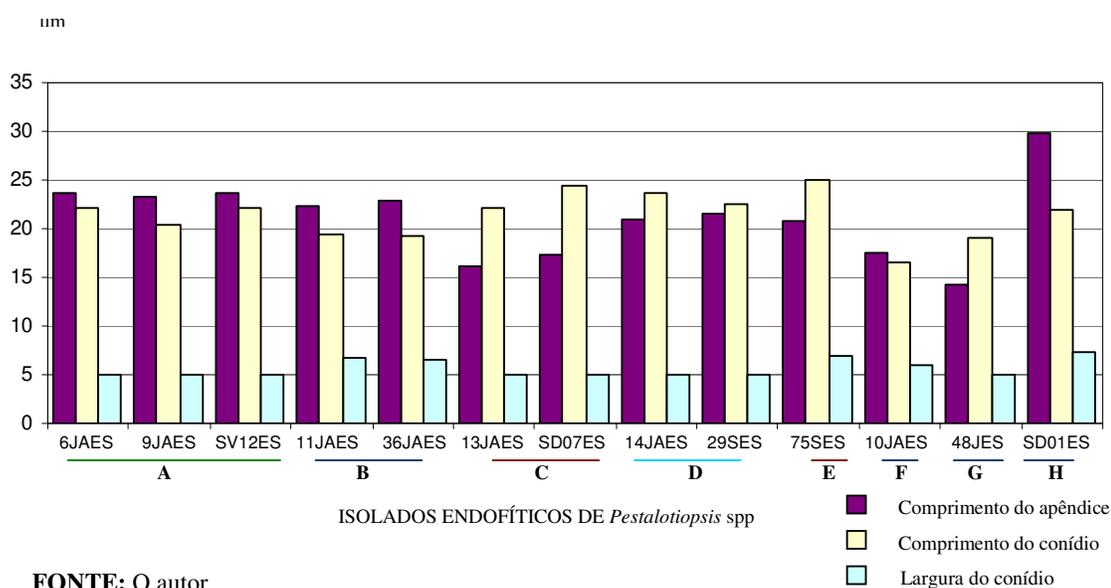


FONTE: O autor

NOTA: C. comprimento dos conídios; L. largura dos conídios e A.comprimento dos apêndices

Quando as medidas dos conídios foram avaliadas apenas em meio BDA, obteve-se a formação de diferentes grupos de isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. (Figura 15).

FIGURA 15 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DE MEDIDAS DO COMPRIMENTO E LARGURA DOS CONÍDIOS E COMPRIMENTO DOS APÊNDICES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. EM MEIO BDA, APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



FONTE: O autor

Ao avaliar as características de microscopia dos isolados endofíticos 48JAES, 14JAES e SD01ES tornam-se evidentes as diferenças morfológicas (Figura 16), tanto na forma, coloração dos conídios e disposição dos apêndices. O isolado endofítico 48JES apresentou os conídios de coloração uniforme, forma retilínea e os apêndices, além de apresentarem-se curtos têm forma variada. No isolado endofítico 14JAES a coloração não foi uniforme, duas células medianas superiores são mais escuras em relação à inferior, a forma do conídio é curva e

apêndices são longos e retilíneos. O isolado endofítico SD01ES apresentou as mesmas características morfológicas do anterior, com exceção da forma do conídio que é curva e maior em relação aos demais.

FIGURA 16 - MICROMORFOLOGIA DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 48JES, 14JES E SD07ES DE *Pestalotiopsis* spp. EM MEIO BDA APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



FONTE: O autor

NOTA: Isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. (48JES; 14JES e SD07ES respectivamente) ; As setas indicam a diferença micromorfológica entre os apêndices dos diferentes isolados.

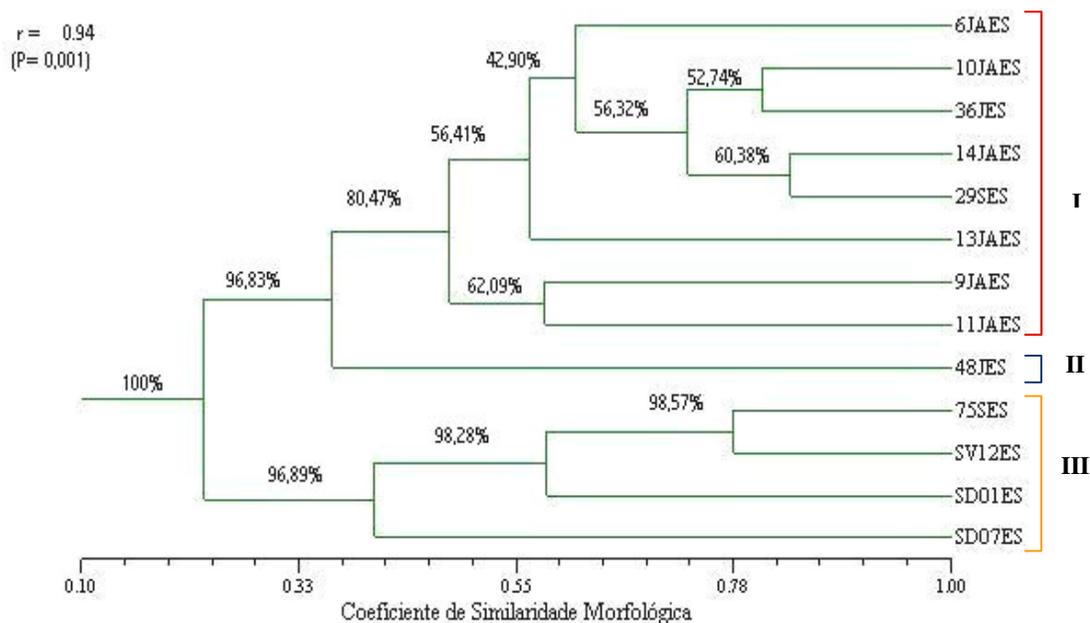
YASUDA, KOBAYASHI e IZADA (2003) identificaram as espécies de *P. longiseta*, *P. glandicola*, *P. acaciae* e *P. crassiuscula*. KEITH, MAILE e ZEE (2006) identificaram *P. clavispora*, *P. disseminata*, e *P. microspora* e finalmente HOPIKINS e McQUILKEN (2000) identificaram *P. sydiwiana*. Entretanto, as espécies apresentaram medidas conidiais similares entre si, destacando a dificuldade de identificar espécies do gênero *Pestalotiopsis* apenas fazendo uso de características morfológicas.

Tanto JEEWON et al. (2003) quanto KEITH, MAILE e ZEE (2006) reforçam que espécies contendo conídios morfológicamente semelhantes são

difíceis de serem identificadas. Além disso, muitas vezes as características morfológicas são discordantes da análise filogenética. Porém, KEITH, MAILE e ZEE (2006) no mesmo trabalho ressaltam que dependendo do comprimento da seqüência nucleotídica utilizada, dois isolados podiam agrupar tanto com *P. microspora* como com *P. clavispora*. Mas quando foram utilizadas características morfológicas, particularmente o comprimento dos apêndices, foi possível a identificação como *P. clavispora*.

Desta forma, as características macroscópicas (coloração e forma da colônia, esporulação em diferentes meios de cultura) e de micromorfologia dos conídios, avaliadas isoladamente, não permitiram propor identificação das espécies dos isolados endofíticos de *Pestalotiopsis*, baseando-se em dados da literatura. Sendo assim, optou-se por realizar uma análise polifásica agrupando as características morfológicas analisadas, tais como: crescimento, morfologia, coloração, tipo de micélio, bordos da colônia; presença ou ausência de acérvulos sobre a colônia; modificação na coloração do meio; taxa de esporulação; comprimento de apêndices; comprimento, largura e coloração dos conídios. Para todas estas características foram atribuídas notas de 0 ou 1, onde 0 representou ausência da característica naquele critério e 1, a presença (Anexo 14). Os resultados compuseram uma matriz binária, analisada pelo software NTSYS (coeficiente Jaccard) com o agrupamento pelo método UPGMA permitindo construção de um dendrograma de similaridade morfológica (Figura 17).

FIGURA 17- DENDROGRAMA GERADO A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.



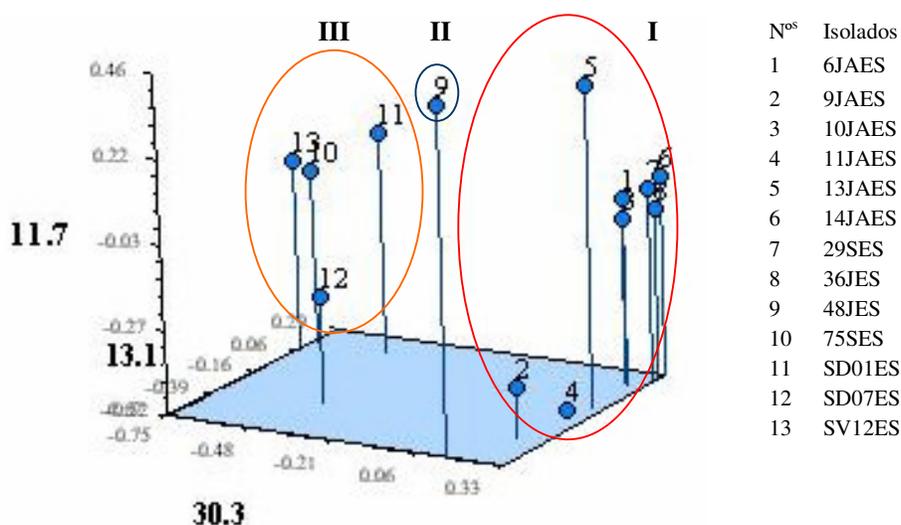
FONTE: O autor

NOTA: **I**, **II** e **III** são grupos formados para inferir sobre a diversidade de espécies isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp.; Os valores sobre as linhas indicam os valores de *bootstrap*.

De acordo com dendrograma de similaridade morfológica (Figura 17), sugere-se a formação de 3 grupos isolados de *Pestalotiopsis* spp. No grupo I, estão reunidos os isolados 6JAES, 9JAES, 10JAES, 11JAES, 13JAES, 14JAES, 29JES e 36JES; no grupo II apenas o isolado 48JES e no grupo III, os isolados 75ES, SD01ES, SD07ES e SV12ES.

A diversidade das espécies de isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. está melhor representada na Figura 18.

FIGURA 18 - ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS DE SIMILARIDADE MORFOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.



FONTE: O autor

NOTA: I, II e III são grupos formados para inferir sobre a diversidade de espécies isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp.;

5.2.2 Características moleculares de *Pestalotiopsis* spp. por RAPD

Os 13 isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. foram avaliados quanto a sua variabilidade genética por meio da técnica de RAPD. Posterior a extração do DNA, estes foram submetidos a uma análise eletroforética para determinar a integridade e a concentração do DNA genômico dos isolados. Segundo GLIENKE (1995) e WILLIAMS et al. (1990) é importante ensaiar diferentes concentrações de DNA e de cloreto de magnésio. Uma baixa concentração de DNA pode levar a perda da amplificação de bandas importantes,

assim como o excesso de DNA dificulta a leitura das bandas. Uma concentração maior de magnésio pode ocorrer uma amplificação maior de algumas bandas e diminuir a amplificação de outras. Para os ensaios da caracterização molecular foram selecionados doze *primers* (Operon Technologies[®]) que originaram bandas em maior quantidade e de melhor qualidade nas reações de PCR (Tabela 5).

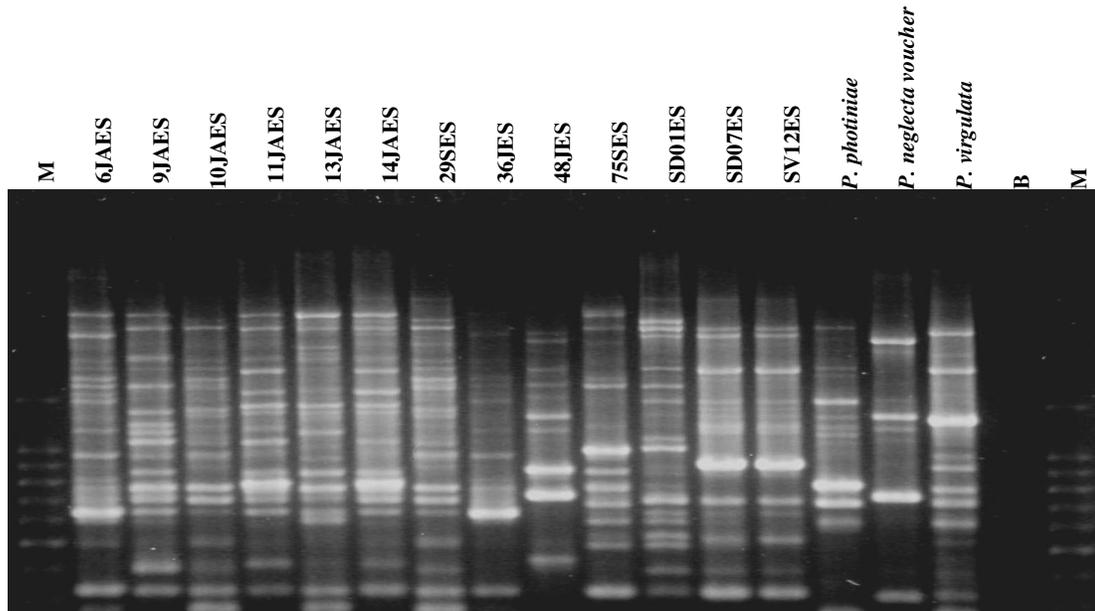
TABELA 5 – *PRIMERS* UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD E NÚMERO DE BANDAS AMPLIFICADAS

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' – 3'	Conteúdo CG %	Nº de bandas
OPX3	5' TGGCGCAGTG3'	70%	27
OPX4	5' CCGTACCGA3'	70%	25
OPX8	5' CAGGGGTGGA 3'	70%	23
OPX9	5' GGTCTGGTTG 3'	60%	26
OPX11	5' GGAGCCTCAG 3'	70%	26
OPX12	5' TCGCCAGCCA 3'	70%	20
OPX13	5' ACGGGAGCAA 3'	60%	18
OPX18	5' GACTAGGTGG 3'	60%	22
OPX14	5' ACAGGTGCTG 3'	60%	26
OPX19	5' CCCAGCTAGA 3'	60%	22
OPC4	5' CCGCATCTAC 3'	60%	23
OPE6	5' AAGACCCCTC 3'	60%	17

FONTE: O autor

O conjunto de *primers* escolhidos permitiu a amplificação de 275 bandas polimórficas, algumas ilustradas nas Figuras 19 a 23. A análise pelo software NTSYS (coeficiente Jaccard) permitiu construção de um dendrograma de similaridade genética (Figura 25A).

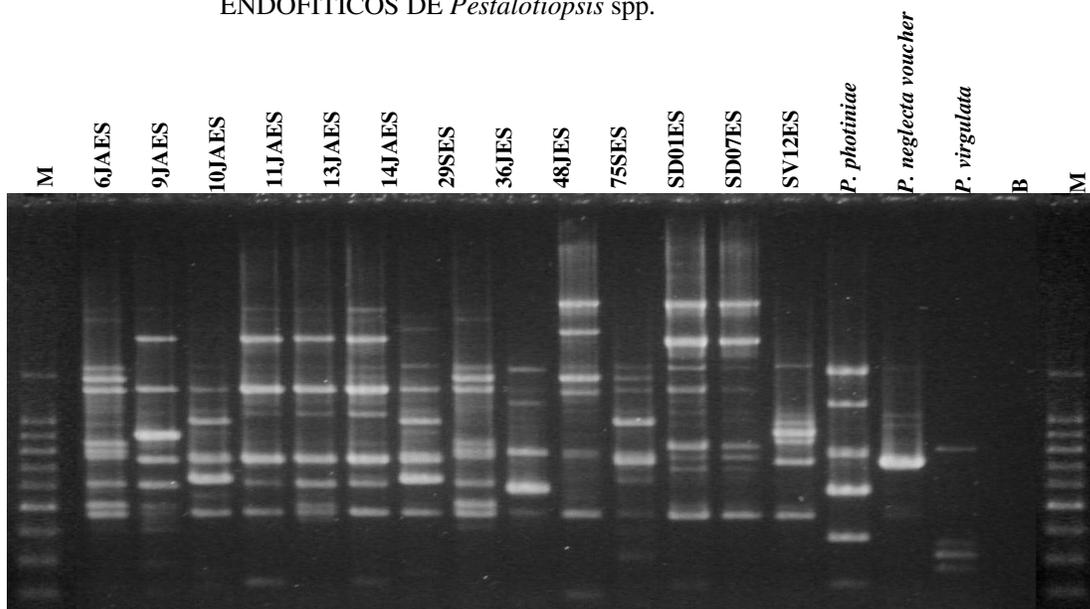
FIGURA 19 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O PRIMER OPX 11 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.



FONTE: O autor

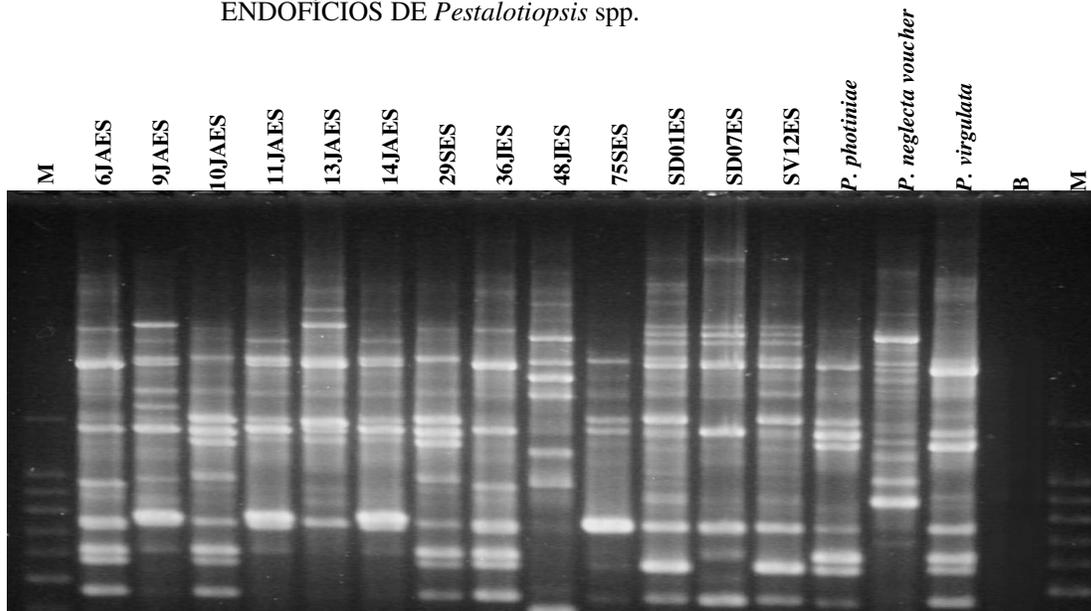
OBS: Para todos as figuras : **M**: Marcador de Peso Molecular *ladder* de 100 pb; **B**: Branco (controle sem DNA).

FIGURA 20 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O PRIMER OPX 18 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.



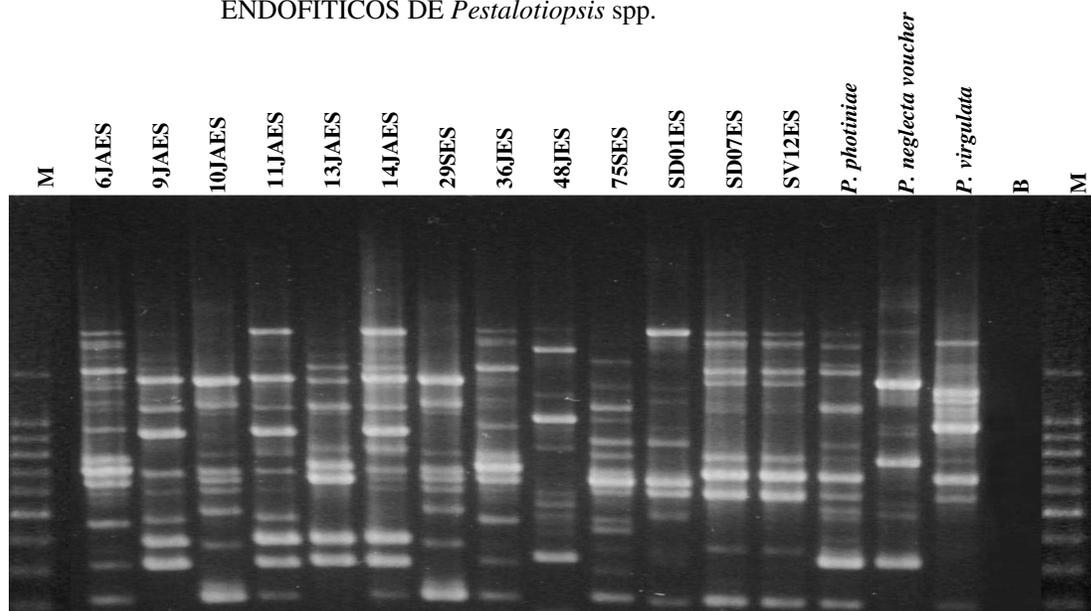
FONTE: O autor

FIGURA 21- PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O PRIMER OPX 09 DOS ISOLADOS ENDOFÍCIOS DE *Pestalotiopsis* spp.



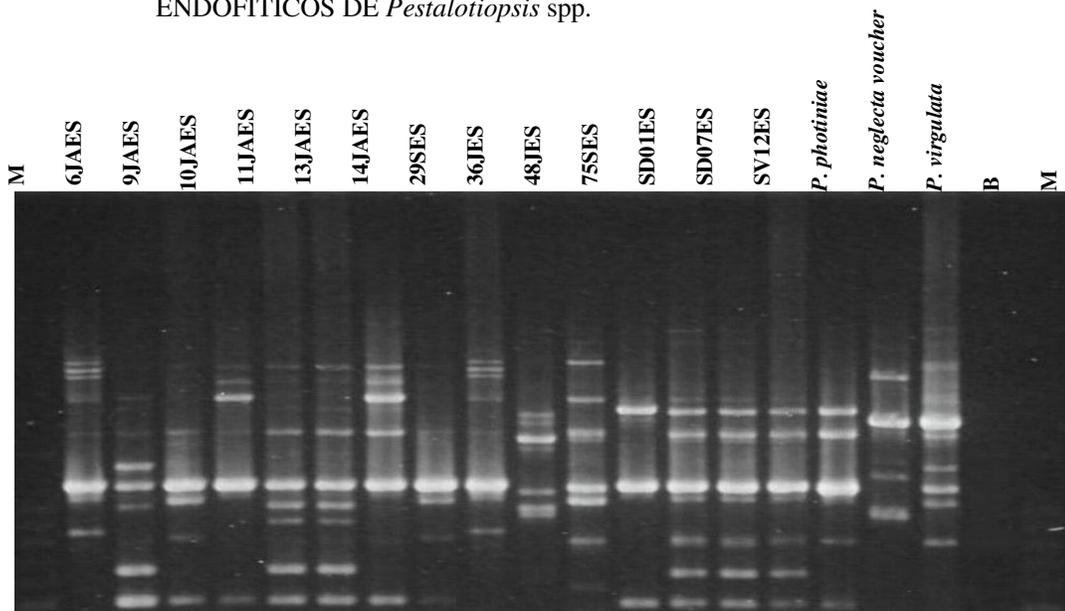
FONTE: O autor

FIGURA 22 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O PRIMER OPX 04 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.



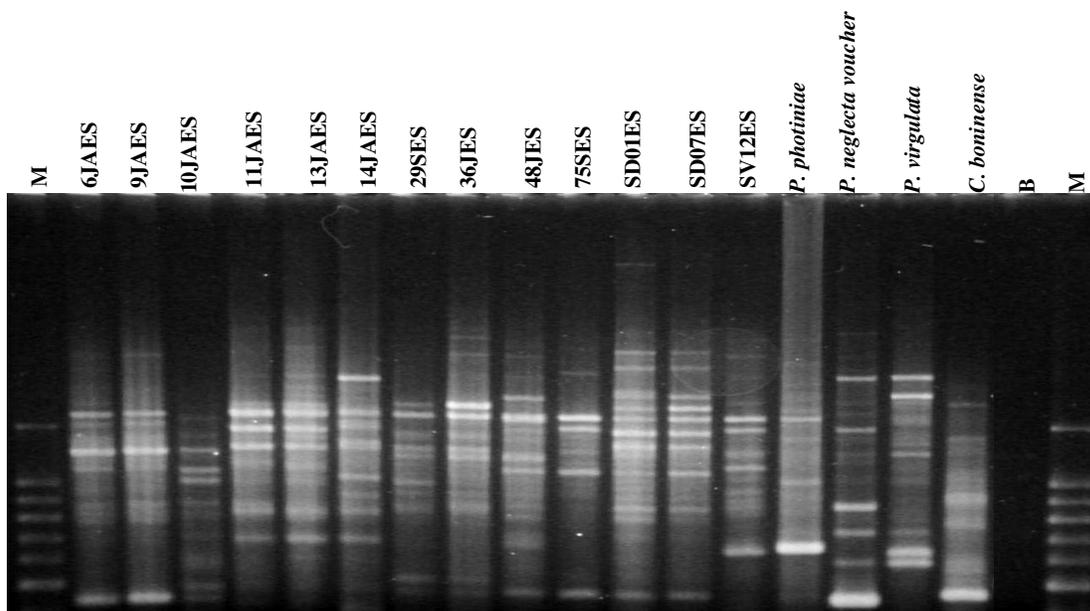
FONTE: O autor

FIGURA 23 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O PRIMER OPX 08 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.



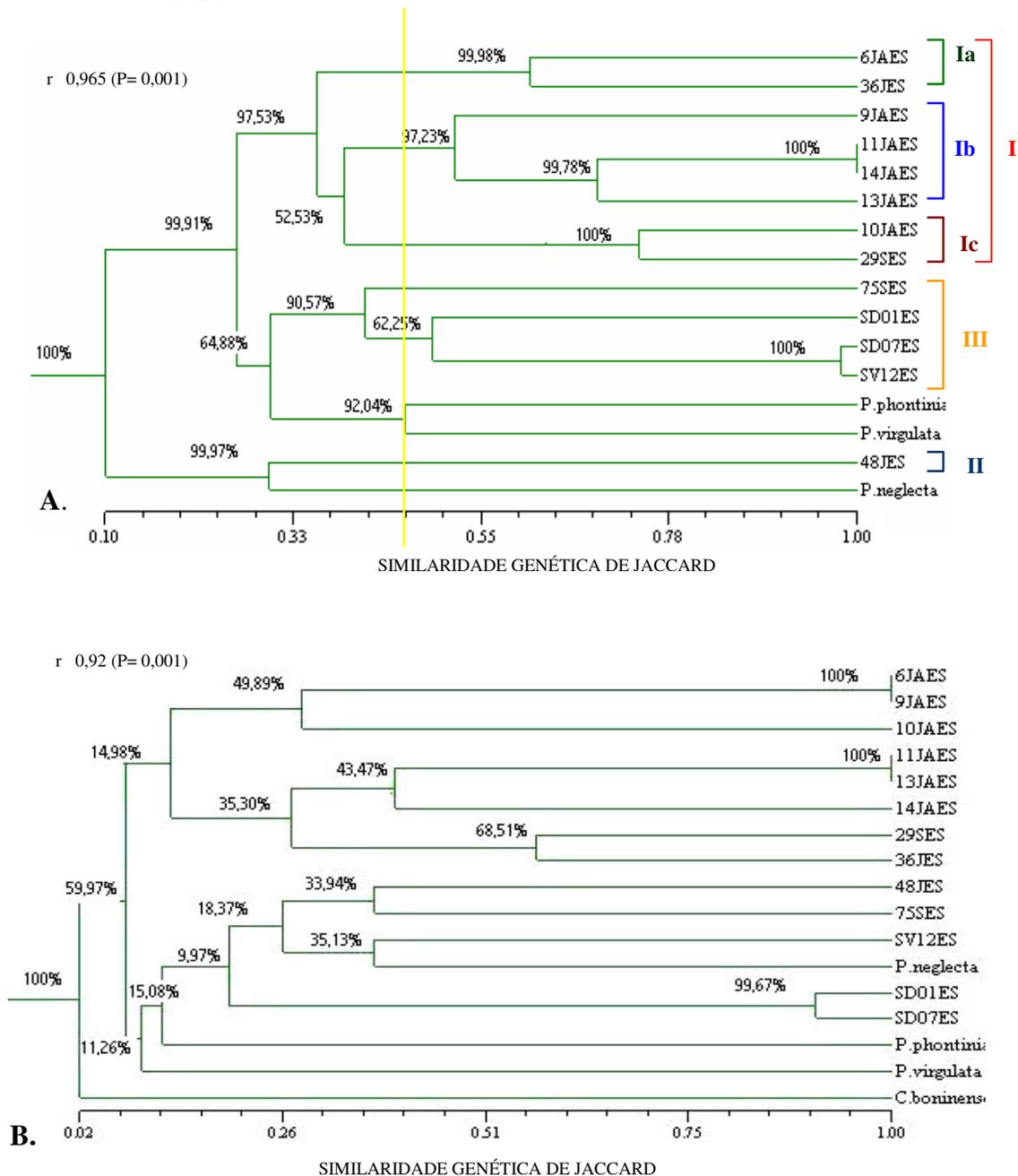
FONTE: O autor

FIGURA 24 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO COM O PRIMER OPX 12 DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. E GRUPO EXTERNO *C. boninense*



FONTE: O autor

FIGURA 25 - DENDROGRAMAS GERADOS A PARTIR DOS DADOS DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS DE ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD



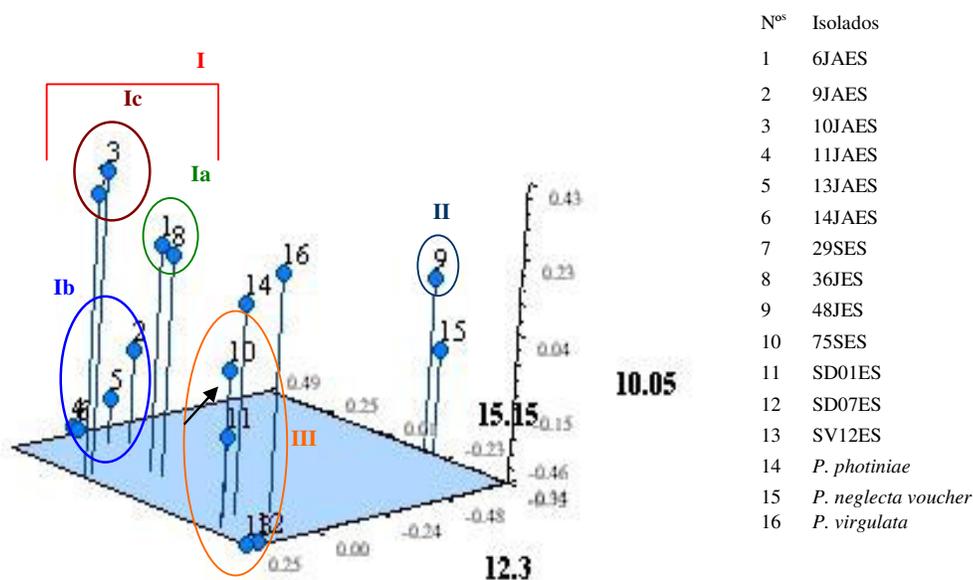
FONTE: O autor

NOTA: r : valor de correlação da matriz pelo teste de Mantel; **A.** Dendrograma com isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp.; **B.** Dendrograma com isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. e de *C. boninense*; **I a III.** Agrupamentos sugerindo a separação de espécies de *Pestalotiopsis* spp. e concordantes com as Figuras 18 e 19.

Os coeficientes de correlação das matrizes de similaridade genética e cofenética, obtidos pelo teste de Mantel, foram elevados em ambos os dendrogramas da Figura 25, indicando que representam de forma adequada a matriz de similaridade genética obtida pelos marcadores RAPD. Os valores de *bootstrap* conferem robustez aos agrupamentos obtidos. No dendrograma A (Figura 25) um número maior de bandas foi analisados, resultando em valores altos de *bootstrap*. Para construção do dendrograma B (Figura 25), utilizou-se apenas a amplificação obtida a partir do *primer* OPX12 (Figura 24), com a análise de apenas 29 bandas, justificando os menores valores de *bootstrap*. Esta análise foi realizada posteriormente, mas a inclusão da espécie de *C. boninense* foi importante, pois permitiu inferir a magnitude da variabilidade genética observada entre os isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. em 3 grupos, está melhor representada na Figura 26.

Levando em consideração o posicionamento dos isolados referência *P. virgulata* e *P. photiniae*, o isolado endofítico 75SES (apontado pela seta – Figura 26) parece estar distante geneticamente do grupo formado por SD01ES, SD07ES e SV12ES. Porém, comparando as figuras que apresentaram o perfil das ampliações geradas por RAPD (Figuras 19 a 24), ficou evidente que ora o isolado endofítico tem bandas de amplificação iguais a SD01ES, ora iguais a SV12ES. Somadas às informações obtidas com o dendrograma gerado a partir da similaridade morfológica (Figura 17), sugere-se que os 4 isolados endofíticos sejam caracterizados como uma única espécie, pertencentes ao grupo III.

FIGURA 26 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS *Pestalotiopsis* spp.



FONTE: O autor

NOTA: **I, II, III**, representam os grupos formados no dendrograma A da Figura 25; **Ia, Ib, Ic** são subgrupos do grupo **I**.

De acordo com os dendrogramas de similaridade morfológica (Figura 17) e de similaridade genética (Figura 25A), os isolados endofíticos 6JAES, 9JAES, 10JAES, 11JAES, 13JAES, 14JAES, 29JES e 36JES foram agrupados no grupo I. Porém é importante destacar, no dendrograma 25A, a presença de linhagens endofíticas referência Sendo *P. neglecta voucher* e *P. virgulata* espécies distintas, os isolados endofíticos com a mesma distância de similaridade genética (alinhados pela linha amarela – Figura 25A) poderiam ser considerados espécies diferentes, por isso foram colocados em subgrupos (Ia, Ib, Ic). Na análise de componentes principais, ficou mais evidente a formação destes subgrupos ou grupos (Figura 26). Sugere-se o seqüenciamento de regiões ITS1-

5,8S-ITS2 do rDNA para que estas informações sejam confirmadas (dados preliminares de seqüenciamento e não mostrados aqui, sugerem que os isolados endofíticos 14JAES, 29SES, 6JAES, 9JAES e SD01ES possam pertencer a espécie *P. microspora*, enquanto o isolado 48JAES pertence a espécie *P. vismeae*).

Tais resultados evidenciam a dificuldade de características morfológicas analisadas individualmente, como mensuração dos conídios, para estabelecer a separação dos isolados de *Pestalotiopsis* em espécies. Assim, este trabalho propõe a utilização de uma análise polifásica das características morfológicas de *Pestalotiopsis*, uma vez que desta forma, foi possível correlacionar as informações morfológicas e moleculares para os isolados estudados. A comparação de matrizes de similaridade morfológica e genética, obtido pelo teste de Mantel apresentou coeficiente de correlação igual a 0,46. A análise polifásica atualmente vem sendo realizada com freqüência em estudos de diversidade bacteriana, utilizando-se características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e moleculares (KIM et al., 2006 a, b; NEDASHKOVSKAYA et al., 2006) e esporadicamente na identificação de leveduras (SAMPAIO et al., 1999; VILLA-CARVAJAL et al., 2004). Em fungos filamentosos a análise polifásica de características morfológicas foi utilizada com sucesso na taxonomia de *Penicillium* (FRISVAD e SAMSON, 2004) e *Aspergillus* (FRISVAD et al., 2004).

Sugere-se a realização de uma análise de decomposição dos componentes principais visando a determinação das características mais

importantes para identificação de espécies em *Pestalotiopsis*. A análise visual da matriz binária de características morfológicas (Anexo 14) visando a determinação destes componentes, indicou a coloração do reverso da colônia, a coloração do micélio e a pigmentação no meio de cultura como as características principais. Por outro lado, o tamanho, forma e coloração dos conídios apresentaram-se como características secundárias. Tais resultados serão confirmados por análise de decomposição dos componentes principais em trabalhos futuros.

Em função da variabilidade genética de *Pestalotiopsis* spp. encontrada entre os 13 isolados endofíticos de espinheira santa, sugere-se que sejam realizados novos isolamentos para uma avaliação de bioprospecção mais aprofundada destes isolados. De acordo com os dados preliminares (Comunicação pessoal de VICENTE, V. A., 2006), tornou-se possível sugerir a presença de *P. microspora*, entre os isolados endofíticos. Os resultados apresentaram-se promissores, pois, esta espécie ganhou destaque nos últimos anos devido a produção do taxol e outros metabólitos secundários, com propriedades antifúngicas, antitumorais e antioxidantes, destacando o grande potencial biotecnológico (LEE et al., 1996; STROBEL et al., 2000; LI et al., 2001; STROBEL et al., 2002; STROBEL e DAISY, 2003). Entretanto tornam-se necessários estudos mais aprofundados, como a realização de testes que avaliem também a atividade antitumoral, pois recentemente, detectou-se a inibição da atividade de células de tumor gástrico, por espécies de *Pestalotiopsis* isolados como endófitos de plantas medicinais chinesas (LI et al., 2005).

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

- As plantas de espinheira santa estudadas apresentaram-se colonizadas por diversos fungos filamentosos, incluindo espécies de *Pestalotiopsis*;

- Os extratos metanólicos de isolados endofíticos de *Pestalotiopsis* spp. exibem atividade antimicrobiana contra diferentes patógenos de humanos, sugerindo o grande potencial deste gênero a ser explorado em bioprospecção;

- Os isolados endofíticos 69JES 70JES apresentam potencial para o controle biológico da MPC, exibindo ação fungistática contra *G. citricarpa*;

- Os marcadores moleculares e morfológicos sugerem a presença de pelo menos três espécies de *Pestalotiopsis* como endofíticos de plantas de espinheira santa estudadas;

- As características morfológicas de *Pestalotiopsis* spp. podem ser utilizadas na análise polifásica, corroborando com os dados obtidos de marcadores moleculares para confirmar a diversidade das espécies deste gênero.

7. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2000. Mercados e Perspectivas. **Anuário da Agricultura**. São Paulo: FNP 2000, 286p.

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.

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 467- 470, 2005.

AMORIM, E. P. R. Occurrence of *Pestalotiopsis guepinii* (Sin. *Pestalotia guepinii*) on anthurium (*Anthurium andraeanum*) in Brazil. **Summa Phytopatology**, v. 25, p. 363-364, 1999.

AMORIM, E. P. R e MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, 2002.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archive of Biology and Technology**, v. 43, p. 447- 457, 2000.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros**. Piracicaba, São Paulo, 1996. 111f. Dissertação de Mestrado, Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; LIMA, A. O. S.; MARCOM, J.; SOBRAL, J. L.; LACAVAL, P. T. **Manual: Isolamentos de fungos endofíticos**. Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARAYA, C. M.; ALLEYNE, A. T.; STEADMAN, J. R. Phenotypic and genotypic characterization of *Uromyces appendiculatus* from *Phaseolus vulgaris* in the Americas. **Plant Disease**, v. 88, p. 830-836, 2004.

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.

AUFAUVRE-BROWN, A.; COHEN, J.; HOLDEN, D. W. Use randomly amplified Polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2991-2993, 1992.

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. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n. 2 , p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Microbiology**, v. 3, p. 40-65, 2000.

BACON, C. W.; WHITE, J. F. Microbial endophytes. **Marcel Dekker Inc.**, New York, N.Y. 2000.

BARBOSA, M. A. G.; REHN, G .K.; MENEZES, M.; LIMA, R.; MARIANO, R. Antagonism of OF *trichoderma* species on *Cladosporium Herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 98-104, 2001.

BASTOS, C. L.; BEZERRA, J. L.; SANTOS, A. O. Ocorrência de *Pestalotiopsis cruenta* em mangostão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, 2001.

BASUALDO, I. Medicinal Plants of Paraguay: Underground Organs, II. **Economy Botany**, v. 49, p. 387-394, 1995.

BELABID, L.; BAUM, M.; FORTAS, Z.; BOUZNAD, Z.; EUJAYL, I. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 25-31, 2004.

BERSANI-AMADO, C. A.; MASSAO, L. B.; BAGGIO, S. R.; JOHANSON, L.; ALBIEIRO, A. L.; KIMURA, E. Antiulcer effectiveness of *Maytenus aquifolium* spray dried extract. **Phytherapeutic Research**.,v. 14, p. 543-545, 2000.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguaraúna: **Embrapa CNPDA**, 1991, 388 p.

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. 58f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.

BLANCO, C. G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética cariotípica e interação com o hospedeiro**. Piracicaba, 1999. 200f. Dissertação (Doutorado) – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CAMILLI, E. C.; CARBONARI, M.; SOUZA, N. L. Caracterização de *Pestalotiopsis longisetula* e sua patogenicidade em morango. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 2, p. 213-214, 2002.

CARDOSO, J. E.; MAIA, C. B.; PESSOA, M. N. G. Ocorrência de *Pestalotiopsis psidii* e *Lasiodiplodia theobromae* causando podridão no caule da goiabeira no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, 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.

CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp. (espíneira-santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: Carlini, E. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “espíneira-santa” e outras). Brasília: CEME/AFIP. p.21-35. 1988.

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.

CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* MOL. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. Campinas, 1992. 253f. Dissertação de Doutorado - Instituto de Biologia. UNICAMP.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A.; TEPLow, D. B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, p. 2675-2685, 2002.

- CLAY, K. Fungi and the food of the goods. **Nature**, v. 427, p. 401-402, 2004.
- COELHO, A. S. G. **Software Bood**, v 3. 04, 2005.
- COIMBRA, R.; SILVA, E D. Notas de Fitoterapia. 2ª Edição. **Laboratório Clínico Silva Araújo S/A**. 1958.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: **The American Phytopathological Society**, 1993, 539 p.
- COOKE, D. E. L.; KENNEDY, D. M.; GUY, D.C.; RUSSELL, J.; UNCKLES, S.E.; DUNCAN, J. M. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 100, p. 297-303, 1996.
- 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 of Basic Microbiology**, v. 48, p. 157-160, 2004.
- CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B.; BOLZANI, V.S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapeutic Research**, v. 17, p. 913-916, 2003.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University press**, 1981.
- CRUZ, G.L. Livro Verde. Vol.II. 1a **Editora Belo Horizonte-Minas Gerais**. 1965.
- DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; EZRA, D., CASTILLO, U.; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Muscodor vitigenus*, sp. nov., an endophyte from *Paullinia*. **Mycotaxon**, v. 84, p. 39-50, 2002a.
- DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; SEARS, J.; WEAVER, D. K.; RUNYION, J. B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 148, p. 3737-3741, 2002b.

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.

DE MARCO, J. L.; IGLIS-VALADARES, M. C.; FELIX, R. C. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of Witches' Broom Disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 33-38, 2003.

DREYFFUS, M. M.; CHAPPELLA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In V. P. Gullo (ed.), The discovery of natural products with therapeutic potential. **Butterworth-Heinemann, London, United Kingdom**, p. 49-80, 1994.

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

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.

ESPOSITO, 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.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. R.; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, 2005.

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.; FEICHTENBERGER, E. Mancha preta ou pinta preta dos citros. **Laranja & Cia**, v. 43, p.10-11, 1996.

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

FEREIRA, 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.

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

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

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.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995. 115 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.

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

GÓES, A. et al. **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: **Tall. Graf. Cerrito**. 149 p. 1937.

GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J., DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia* **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, 2001.

GUBA, E. F. Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia*. In: JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 372–383, 2003.

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**, v. 82, p. 832-835, 1992.

GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L.; NODARI, R.; JOHNSON, W. C.; TEMPLE, S. R.; MANDALA, D.; MIKANDAWIRE, A. B. C.; GEPTS, S. Characterization of variability in the fungus *phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Phytopathology**, v. 85, p. 600-607, 1995.

GUZMÁN, P.; GEPTS, P.; TEMPLE, S.; MKANDAWIRE, A. B. C.; GILBERTSON, R. L. Detection and differentiation of *Phaeoisariopsis griseola* isolates with the polymerase chain reaction and group-specific primers. **Plant Disease**, v. 83, p. 37- 42, 1999.

HOPKINS, K. L.; McQUILKEN, M. P. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 77- 85, 2000.

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. Oligo-nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of natural Prodcets**. v. 56, p. 1479-1485,1993.

JAMIL, F. F.; SARWAR, N.; SARWAR, M.; KHAN, J. A.; GEISTLINGER, J.; KAHAL, G. Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. Populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arientinum* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 243-254, 2000.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 25, p. 378–392, 2002.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic signicance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 372–383, 2003.

JIMÉNEZ-GASCO, M.; PÉREZ-ARTÉS, W.; JIMÉNEZ-DIAZ, R.M. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp.

Ciceris with random amplified polymorphic DNA (RAPD). **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.237-248, 2001.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P.; TAGLIATI, C. A..Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93-100, 2004.

KASSAWARA, M. M. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. Piracicaba, São Paulo. 2005. 111f. Tese de Doutorado, - Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

KEITH, L. M.; MAILE, E. V.; ZEE, T. F. Identification and Characterization of *Pestalotiopsis* spp. Causing Scab Disease of Guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. **Planta disease**, v. 90 , p. 16-23, 2006.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. Micologia Médica. 2^a ed. São Paulo: **Editora Premier**, p. 256, 1999.

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 yejuensis* sp nov., isolated from greenhouse soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2079-2082, 2006.

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

LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOSKY, E.; CLARDY, J. C. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61. p. 3232-3233, 1996.

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

LI, J. Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; TOMBE, B. O.; BASHYAL, B.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, v. 56(5), p. 463-468, 2001.

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.

LIEW, E. C. Y.; IRWING, J. A. G. Comparative studies on *Phytophthora megasperma* isolates from chickpea in Australia and Spain. **Micological Research**, v. 98, p.1284-1290, 1994.

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

LIU, D; HEESWIJCK, R.; LATCH, G.; LEONFORTE, T.; PANACCIO, M.; LANGFORD, C.; CUNNINGHAM, P.; REED, K. Rapid identification of 99 *Acremonium lolii* and *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 133, p.95-98, 1995.

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**, v. 151, p. 67-73, 2000.

MAITAN, V.R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. Goiânia, 1998. 122f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás.

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.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Science agriculture**.v. 55, n. 1, 1998.

McCLELLAND, M.; WELSH, J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **Oxford**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

MEIRA PENNA. **Dicionário Brasileiro de Plantas Medicinais**. 3^a Ed. **Editora Kosmos**, Rio de Janeiro, 1946.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Jaguaraúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 1998, v. 1, 262 p.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to

detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 88, p. 828-982, 1991.

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.

MONTEALEGRE, J. R.; REYES, R.; PÉREZ, L. M.; HERRERA, R.; SILVA, P.;BESOAIN, X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato.**Electronic Journal of Biotechnology**. v. 6, 2003.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M., LIMA, M. L. R. Z. C.; POSSAMAI, J. C. Controle em pós colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 395-398, 2002.

MOSTAFA, M.; REZA, Z. M.; OMID, J.; JAVAD, H. M. Use of rapd, enzyme activity staining, and colony size to differentiate phytopathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from Iran. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.299-303, 2002.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) **Ciência e Agrotecnologia**.v. 23, n.2, p. 281-288, 1999.

NAG, R. Redisposals and redescription in the *Monchaetia*, *Seiridium*, *Pestalotia Pestalotiopsis complexes*. I. The correct name for the type species of *Pestalotiopsis*. **Mycotaxon** , v. 22, p. 43–51, 1985.

NAG, R. In: Coelomycetous Anamorphs with Appendage Bearing Conidia. **Mycologue Publications**, Waterloo, Ontario, Canada, p. 1101, 1993

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 brevivitae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2037-2041, 2006.

PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize *Zea*

mays L. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 391-396, 2002.

PANACCIONE, D. G.; JOHSON, R. D.; WANG, J.; YOUNG, C. A.; DAMRONGKOLL, P.; SCOTT, B.; SCHARDT, C. L. Elimination of ergovaline from a grass *Neothyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 98, p. 12820-12825, 2001.

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

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 62-76, 2002

PELAES, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, M.; DIEZ MATAS, I.B.; GARCIA,A.; GONZALEZ DEL VAL, V.; GONZALEZ, J.; GORROCHATEGUI, P.; HERNANDEZ, I.; MARTIN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Microbiology Research**, v. 102, p. 755-761, 1998.

PEREIRA, J. O. **Fungos endofíticos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendesh***. Piracicaba, 1993. 105 p. Tese de Doutorado - Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PEREIRA, J. O ; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. **Micologia**, v.85, p. 362-364, 1993.

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

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, Paraná, 2006. 141f. Tese de Doutorado– Universidade Federal do Paraná.

PIMENTEL, I. C. **Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de**

pragas agrícolas. Curitiba, 2001. 154f. Dissertação de Doutorado - Universidade Federal do Paraná.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A. M.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos do Milho (*Zea mays* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas. **In Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001a, p. 24.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A.M.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos da Soja (*Glycine Max* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas. **In Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001b, p. 28.

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

RADOMSKI, M. I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa – Paraná.** Curitiba, 1998. 98f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.

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

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.

RODRIGUES, K. F.; DIAS-FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, p. 905-909, 1996.

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, p. 261-267. 2000.

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**, 1998.

ROY, S.; SIMON, J. P.; LAPOINTRE, F. J. Determination of origin of the coldadapted populations of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) in eastern

North America: a total evidence approach using RAPD DNA and DNA sequences. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, p.1501-1513, 2000.

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 Biology Science**, v. 1, p. 24-33, 2005.

SAIKKONEM, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: A continuum of interaction with Host Plants. **Annual Reviews ecology Systematic**, v. 29, p. 319-343, 1998.

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

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

SEMA –SECRETARIA DO ESTADO DO MEIO AMBIENTE. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Paraná**. Curitiba, SEMA, 130p, 1995.

SHALINI, N.; LATA, K. L.; KOTASTHANE, A. S. Genetic relatedness among *Trichoderma* isolates inhibiting a pathogenic fungi *Rhizoctonia solani* .**African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 508-584, 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.

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-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p. 27-32, 2002.

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, p71-78,2002.

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

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: **Editora da Universidade/UFRGS**. 174p, 1986.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical Taxonomy. San Francisco: **W.H. Freeman and Company**, 1973. 573p.

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

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; et al. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.

SOUZA, L. P.; ASTOLFI F. S.; PEREIRA, J.O. Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais. **Resumos da 7ª Reunião Especial da SBPC**. Manaus-AM, 2001.

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 bentham*. **Acta Amazonic**.v. 34, n.2 , p. 185-195, Manaus, 2004.

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.

STEYAERT, R. L. Contributions _a letude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.In: JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; HYDE, K.D. Phylogenetic signi.cance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 372–383, 2003.

STRINGARI, D. **Estudo da Variabilidade Genética de *Guignardia* ssp. Por meio de Marcadores RAPD e seqüências ITS.** Curitiba, 2004. 101f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.

STROBEL, G. A.; STIERLE, A.; STIERLE, D.; HESS, W. M. *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a *bulbilliferous hyphomycete* associated with Pacific yew. **Mycotaxon**, v. 47, p. 71-78, 1993.

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

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E. J.; SIDHU, R. S.; SUMMERELL, B. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol producing endophyte of the *Wollemi Pine*, *Wollemia nobilis*. **Australian Journal Botanic**. v.45, p.1073-1082, 1997.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **ASM News**, v. 64, p. 263-268, 1998.

STROBEL, G. A.; MILLER, R. V.; MILLER, C.; CONDRON, M.; TELOW, D. B.; HESS, W. M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**, v. 145, p. 1919-1926, 1999.

STROBEL, G. A.; LI, J. Y. ; WORAPONG, J. ; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Pestlotiopsis jesterri*, sp. Nov. an endophyte from *Fraea bodenii* from the Southern Highlands of Papua New Guinea. **Mycotacon**, v. 76, p. 257-266, 2000.

STROBEL, G. A.; METZ, A. M.; HADDAD, A.; WORAPONG J.; LONG, D.M.; FORD, E. J.; HESS, W. M. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. **Microbiology**, v 146, p. 2079-2089, 2000.

STROBEL, G. A.; DIRSKE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Review Biotechnologic**, v. 22, p. 315-333, 2002.

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

STROBEL, G. A.; DAISY, B. H. Biosprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. **Kew: Commonwealth Mycological Institute**, 1980, 960p.

TAYLOR-ROSA, S. G.; INCHAUSTI DE 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.

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.

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

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.

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.

WHELISH, J.; McCLELLAND, M. *Fingerprinting* genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p.7213-7218, 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.

WIDYASTUTUI, S. M.; Sensitivity among *Pestalotiopsis* spp. Against the Phytoalexins of Three Rosaceae Plants. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 511-513, 2001.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v. 218, p. 706-740, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBLELIK, A. R. LIVAK, K. J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p. 6531-5, 1990.

YASUDA, F.; KOBAYASHI, H. W.; IZADA, H. Addition of *Pestalotiopsis* spp. to leaf spot pathogens of Japanese persimmon. **Journal Genetic Plant Pathology**, v. 69, p. 29-32, 2003.

YUAN, G. F.; LIU, C. S.; CHEN, C. C. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2384-2387, 1995.

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, p. 1529-1530, 2000.

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

ANEXOS

ANEXO 1 – FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE ESPINHEIRA SANTA.....	120
ANEXO 2 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 6JES, 10JES, 26JES, 53JES E 64JES CONTRA O FITOPATÓGENO <i>Fusarium</i> sp. 151-2.....	121
ANEXO 3 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 69JES E 70JES CONTRA O FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96.....	122
ANEXO 4 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 6JES, 10JES, 26JES, 53JES E 64JES CONTRA O FITOPATÓGENO <i>Fusarium</i> sp. 151-2 E DOS ISOLADOS 69JES E 70JES CONTRA O FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC 13/96 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS.....	123
ANEXO 5 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS CONTRA OS FITOPATÓGENOS <i>G. citricarpa</i> PC13/96 E <i>G. citricarpa</i> 33/05 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS.....	125
ANEXO 6 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS CONTRA O FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS.....	127
ANEXO 7 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS 69JES, 70JES E 78JES CONTRA <i>G. citricarpa</i> PC13/96 E <i>G. citricarpa</i> 33/05 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS.....	128
ANEXO 8 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS ENTRE OS TRATAMENTOS COM EXTRATOS METANÓLICOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 69JES, 70JES CONTRA OS FITOPATÓGENOS <i>G. citricarpa</i> PC13/96 E <i>G. citricarpa</i> 33/05 PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL.....	129
ANEXO 9 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS METANÓLICOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 69JES, 70JES CONTRA <i>G. citricarpa</i> PC13/96 E <i>G. citricarpa</i> 33/05 PARA AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHAS AUTOCLAVADAS.....	130
ANEXO 10 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	131
ANEXO 11 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DA TAXA DE ESPORULAÇÃO PRODUZIDOS PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	132
ANEXO 12- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. MEIO DE CULTURA BDA.....	133
ANEXO 13 - ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS APÊNDICES DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp. MEIO DE CULTURA BDA.....	134
ANEXO 14 - MATRIZ COM DADOS PARA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	135

ANEXO 1 – FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE ESPINHEIRA SANTA

				INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE ESPINHEIRA SANTA											
				<i>Fusarium</i> sp. 151-2				<i>Trichoderma</i> CBNP2F16				<i>G. citricarpa</i> pc13/96			
Nº	ISOLADOS	ID	Pr	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	02JA*		NI			X					X				X
2	03JA*		NI		X						X			X	
3	04JA*	Alter	NI				X				X				X
4	05JA*	Alter	NI				X				X				X
5	06JA*	PTS	NI			X				X			X		
6	07JA*	BAS	NI			X				X			X		
7	09JA*	PTS	NI			X				X					X
8	10JA*	PTS	NI			X				X					X
9	11JA*	PTS	NI			X				X					X
10	12JA*		NI			X				X			X		
11	13JA*	PTS	NI			X				X			X		
12	14JA*	PTS	NI		X								X		
13	01J	BAS	F			X				X			X		
14	03J		F		X					X			X		
15	04J		F			X				X			X		
16	05J		F		X					X					X
17	06J		F	X						X					X
18	09J		F				X			X			X		
19	10J		F	X						X			X		
20	13J	BAS	F				X			X			X		
21	17J		F			X				X					X
22	23J		F				X			X			X		
23	24J		F				X			X			X		
24	25J		F			X				X			X		X
25	26J		F	X						X			X		
26	27J	BAS	F			X				X			X		
27	28J		F		X					X			X		
28	29J		F			X				X			X		
29	36J	PTS	F			X				X					X
30	39J	BAS	F			X				X					X
31	47J	BAS	F			X				X					X
32	48J		F			X				X					X
33	49J		F		X					X					X
34	50J		F			X				X			X		
35	51J		F			X				X			X		
36	52J	BAS	F			X				X					X
37	53J		F	X						X					X
38	61J		F			X				X			X		
39	62J		F			X				X					X
40	63J		F			X				X			X		
41	64J		F	X						X					X
42	65J	BAS	F				X			X			X		
43	66J	BAS	F			X				X			X		
44	67J	BAS	F			X				X			X		
45	68J	BAS	F			X				X					X
46	69J		F				X			X			X		
47	70J		F				X			X			X		
48	73J		F		X					X					X
49	74J		F			X				X			X		
50	77J		F			X				X			X		
51	78J		F		X					X			X		
52	PAC15*		P			X				X					X
53	PAC27*	BAS	P			X				X			X		
54	FAC02*		F			X				X			X		
55	FAC27*	BAS	F			X				X			X		
56	FAC30*		F			X				X			X		
57	FAC44*		F			X				X			X		
58	FAC50*		F			X				X			X		
59	FAC55*		F			X				X			X		
60	FAC68*		F			X				X			X		
61	18S		F			X				X					X
62	29S	PTS	F			X				X					X
63	75S	PTS	F			X				X					X
64	SD01*	PTS	S			X				X					X
65	SD07*	PTS	S			X				X					X
66	SV12*	PTS	S			X				X					X

FONTE: O autor

NOTA: ID. Identificação (Alter: *Alternaria* sp.; PTS: *Pestalotiopsis* spp. e BAS: Basidiomiceto); Pr. Isolado (F. folha, P. pecíolo, S. semente); 1. O isolado endofítico se sobrepõe ao fitopatógeno; 2. Inibição do fitopatógeno por parasitismo; 3. Redução do crescimento do fitopatógeno; 3. Ausência de inibição de crescimento; 4. Inibição do crescimento do isolado endofítico pelo fitopatógeno; * Cedidos cordialmente por PILEGGI (2005)

ANEXO 2 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 6JES, 10JES, 26JES, 53JES E 64JES CONTRA O FITOPATÓGENO *Fusarium* sp. 151-2

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	5	17.82	3.57	24.67**
RESÍDUO	24	3.47	0.15	
Total	29	21.29		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES	
FITOPATÓGENO <i>Fusarium</i> sp. 152-2	5.60 a
26JES	4.28 b
53JES	3.84 bc
10JES	4.04 bc
6JES	3.32 c
64JES	3.32 c

DMS = 0.73

CV% = 9.35

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

ANEXO 3 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 69JES E 70JES CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	2	0.27	0.14	0.96 ns
RESÍDUO	6	0.84	0.14	
Total	8	1.11		

ns não significativo (p-valor \geq .05)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES	
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	1.94 a
69JES	1.57 a
70JES	1.57 a

DMS = 0.94

CV% = 22.16

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

ANEXO 4 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 6JES, 10JES, 26JES, 53JES E 64JES CONTRA O FITOPATÓGENO *Fusarium* sp. 151-2 E DOS ISOLADOS 69JES E 70JES CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC 13/96 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO DAS INTERAÇÕES DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS CONTRA O FITOPATÓGENO *Fusarium* sp. 151-2

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	5	1.85	0.37	2.07 ns
RESÍDUO	12	2.14	0.18	
Total	17	3.99		

ns não significativo (p-valor \geq .05)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES	
FITOPATÓGENO <i>Fusarium</i> sp. 152-2	7.40 a
6JES	6.77 a
10JES	6.60 a
26JES	6.57 a
53JES	7.07 a
64JES	6.50 a

DMS = 1.16 CV% = 6.19

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO DAS INTERAÇÕES DO ISOLADO ENDOFÍTICO 69JES CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC 13/96

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	1	0.11	1.60	ns
RESÍDUO	4	0.27	0.07	
Total	5	0.38		

ns não significativo (p-valor \geq .05)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES	
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/ 96	2.47 a
69JES	2.20 a

DMS = 0.59 CV% = 11.07

**EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO DAS INTERAÇÕES DO ISOLADO
ENDOFÍTICO 70JES CONTRA O FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC 13/96**

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	1	0.81	0.81	5.50 ns
RESÍDUO	4	0.59	0.15	
Total	5	1.40		

ns não significativo (p-valor \geq .05)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES	
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/ 96	3.33a
70JES	2.60 a

DMS = 0.87

CV% = 12.90

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

ANEXO 5 – ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS CONTRA OS FITOPATÓGENOS *G. citricarpa* PC13/96 E *G. citricarpa* 33/05 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

EXPERIMENTO FATORIAL

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FITOPATÓGENOS	1	37.34	37.34	491.75 **
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	62	29.33	0.47	6.22 **
INTER (C x T)	62	23.09	0.37	4.90 **
RESÍDUO	252	19.14	0.075	
Total	377	108.88		

FITOPATÓGENOS: *G. citricarpa* PC13/96 E *G. citricarpa* 33/05

INTER (C x T) : INTERAÇÕES ENTRE OS FITOPATÓGENOS E OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DOS FITOPATÓGENOS			
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> 33/05		1.62	a
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96		0.99	b

DMS1 = 0.05

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES

ISOLADOS	Médias	Significância
5	2.12	a
55	1.83	ab
29	1.77	abc
34	1.77	abc
41	1.68	abcd
38	1.63	abcde
12	1.63	abcde
59	1.61	abcde
13	1.61	abcde
20	1.61	abcde
54	1.58	abcde
25	1.58	abcde
60	1.56	abcdef
36	1.55	abcdef
21	1.55	abcdef
31	1.55	abcdef

17	1.52	abcdef
22	1.48	abcdefg
6	1.48	abcdefg
35	1.46	abcdefg
58	1.46	abcdefg
30	1.43	abcdefg
33	1.43	bcdefgh
47	1.48	bcdefgh
11	1.38	bcdefgh
57	1.38	bcdefgh
56	1.38	bcdefgh
26	1.35	bcdefgh
53	1.31	bcdefgh
44	1.31	bcdefgh
19	1.30	bcdefgh
49	1.28	bcdefgh
8	1.25	bcdefgh
40	1.21	bcdefgh
51	1.20	bcdefgh
48	1.18	bcdefgh
46	1.18	bcdefgh
39	1.18	bcdefgh
9	1.18	bcdefgh
1	1.16	cdefgh
42	1.61	cdefgh
45	1.13	cdefgh
10	1.11	cdefgh
14	1.10	defgh
23	1.08	defgh
62	1.01	defgh
63	1.6667	defgh
20	1.05	defgh
43	1.05	defgh
24	1.03	defgh
50	1.01	efgh
52	1.01	efgh
61	1.01	efgh
37	1.01	efgh
18	1.01	efgh
27	1.06	efgh
32	1.00	efgh
15	1.00	efgh
7	0.91	fgh
3	0.88	gh
2	0.86	gh
16	0.86	gh
4	0.80	h

DMS2 = 0.65959

CV% = 21.17865

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 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	2	11.73	5.86	185.32 **
RESÍDUO	12	0.38	0.03	
Total	14	12.11		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES	
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	2.06 a
69JES	0.10 b
70JES	0.28 b

DMS = 0.30003

CV% = 21.87926

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 69JES, 70JES E 78JES CONTRA *G. citricarpa* PC13/96 E *G. citricarpa* 33/05 PARA DETECÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS

EXPERIMENTO FATORIAL

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FITOPATÓGENOS	1	0.32	0.32	1.68 ns
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	3	9.80	3.26	16.91 **
INTER. F X I	3	1.21	0.40	2.08 ns
RESÍDUO	16	3.09	0.19	
Total	23	14.43		

INTER. C x T : INTERAÇÃO ENTRE OS FITOPATÓGENOS E OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

ns não significativo (p-valor >= .05)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DOS FITOPATÓGENOS			
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	2.50	a	
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> 33/05	2.27	a	

DMS1 = 0.38079

MÉDIAS DAS INTERAÇÕES		
70JES	3.05000	a
69JES	2.86667	ab
78JES	2.23333	b
FITOPATÓGENOS	1.41667	c

DMS2 = 0.72700

CV% = 18.38454

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 ENTRE OS TRATAMENTOS COM EXTRATOS METANÓLICOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 69JES, 70JES CONTRA OS FITOPATÓGENOS *G. citricarpa* PC13/96 E *G. citricarpa* 33/05 PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

EXPERIMENTO FATORIAL

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FITOPATÓGENO	1	0.01	0.01	0.07ns
TRATAMENTOS	4	40.57	10.14	92.49 **
INTER Cx T	4	0.19	0.04	0.44 ns
RESÍDUO	20	2.19	0.11	
Total	29	42.97		

INTER. Cx T : INTERAÇÃO ENTRE OS FITOPATÓGENOS E OS TRATAMENTOS

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

ns não significativo (p-valor >= .05)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DOS FITOPATÓGENOS	
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	2.08 a
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> 33/05	2.12 a

DMS1 = 0.25224

MÉDIAS DOS TRATAMENTOS		
METANOL	3.31667	a
ÁGUA	3.23333	a
69JES	2.26667	b
70JES	1.50000	c
FUNGICIDA	0.20000	d

DMS2 = 0.57323

CV% = 15.74451

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 DOS TRATAMENTOS COM EXTRATOS METANÓLICOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS 69JES, 70JES CONTRA FITOPATÓGENO *G. citricarpa* PC13/96 E *G. citricarpa* 33/05 PARA AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS EM FOLHAS AUTOCLAVADAS

EXPERIMENTO FATORIAL TRANSFORMADOS EM log (x+2)

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
FITOPATÓGENO	1	0.12	0.12	2.52 ns
TRATAMENTOS	3	2.84	0.94	18.53 **
INTER F x T	3	0.40	0.13	2.60 ns
RESÍDUO	40	2.04	0.05	
Total	47	5.42		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)
ns não significativo (p-valor >= .05)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DOS FITOPATÓGENOS

FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> PC13/96	2.23	a
FITOPATÓGENO <i>G. citricarpa</i> 33/05	2.13	a

DMS1 = 0.13203

MÉDIAS DOS TRATAMENTOS

ÁGUA DESTILADA	2.36	a
METANOL	2.45	a
69JES	2.08	b
70JES	1.83	c

DMS2 = 0.24

CV% = 10.34

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 DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

EXPERIMENTO FATORIAL

ANOVA				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIOS DE CULTURA	3	4.86	1.62	7.82 **
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	12	391.14	32.59	157.23 **
INTERAÇÃO A	36	38.01	1.05	5.09 **
RESÍDUO	104	21.56	0.20	
Total	155	455.58		

INTERAÇÃO A: INTERAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE CULTURA E OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS ENTRE OS MEIOS DE CULTURA			
	MC	7.05	a
	BDA	6.78	ab
	MEA	6.65	b
	MEA	6.59	b
DMS1		0.26	
MÉDIAS DO CRESCIMENTO MICELIAL DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.			
	10JAES	7.92	a
	SD01ES	7.87	a
	SV12ES	7.80	a
	29SES	7.80	a
	75SES	7.75	a
	SD07ES	7.67	a
	11JAES	7.42	a
	14JAES	7.39	ab
	36JAES	6.90	ab
	6JAES	6.43	b
	13JAES	5.46	c
	48JAES	3.66	d
	9JAES	3.10	d
DMS2 =		0.63	
CV% =		6.72	

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 DA TAXA DE ESPORULAÇÃO
PRODUZIDOS PELOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.
EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

EXPERIMENTO FATORIAL TRANSFORMADOS EM $\log(x+2)$
ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIOS DE CULTURA	3	0.75	0.25	31.40 **
ISOLADOS ENDOFÍTICOS	12	95.03	7.91	983.30 **
INTERAÇÃO A	36	11.06	0.30	38.16 **
RESÍDUO	104	0.83	0.01	
Total	155	107.69		

TOTAL

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

INTERAÇÃO A: INTERAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE CULTURA E A TAXA DE ESPORULAÇÃO
DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.

TESTE DAS MEDIAS

MÉDIAS ENTRE OS MEIOS DE CULTURA			
MEA	0.90		a
MC	0.94		a
BDA	0.83		b
MAV	0.75		c

DMS1 = 0.053

MÉDIAS DA TAXA DE ESPORULAÇÃO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.			
SV12JES		2.41	a
75SES		2.43	a
SD01ES		1.55	b
SD07ES		1.36	c
10JAES		0.73	d
36JES		0.56	e
29SES		0.30	f
14JAES		0.30	f
48JES		0.30	f
13JAES	0.30		f
9JAES		0.30	f
11JAES		0.30	f
6JAES		0.30	f

DMS2 = 0.12

CV% = 10.43

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- ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS CONÍDIOS
DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. MEIO DE
CULTURA BDA

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	12	1033.10	86.09	26.10**
RESÍDUO	182	600.12	3.29	
Total	194	1633.23		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

TESTE DE MÉDIAS

MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.		
75SES	24.94	a
SD07ES	24.40	ab
14JAES	23.69	abc
29SES	22.49	bcd
SV12JES	22.18	bcd
6JAES	22.18	bcd
13JAES	22.14	cd
SD01ES	21.91	cd
9JAES	20.30	de
11JAES	19.35	e
36JES	19.20	e
48JES	19.05	e
10JAES	16.60	f

DMS = 2.22

CV% = 8.47

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

ANEXO 13 - ANOVA E TESTE DE MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS APÊNDICES
DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp. MEIO DE
CULTURA BDA

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

ANOVA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	12	2951.66	245.97	52.66 **
RESÍDUO	182	849.95	4.67	
Total	194	3801.62		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p-valor < .01)

TESTE DAS MÉDIAS

MÉDIAS DO COMPRIMENTO DOS APÊNDICES DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Pestalotiopsis</i> spp.		
SD01ES	29.79	a
6JAES	23.64	b
SV12ES	23.64	b
9JAES	23.29	bc
29SES	21.51	bc
11JAES	22.37	bc
36JES	22.83	bc
75SES	20.78	c
14JAES	20.87	c
10JAES	17.54	d
SD07ES	17.22	d
13JAES	16.24	de
48JES	14.22	e

DMS = 2.64

CV% = 10.25

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

ANEXO 14 - MATRIZ COM DADOS PARA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Pestalotiopsis* spp.

CRITÉRIOS	MEIOS DE CULTURA	MEDIDAS μm	N°s	9JAES	10JAES	11JAES	13JAES	14JAES	29SES	36JES	48JES	75SES	SD01ES	SD07ES	SV12ES		
1	BDA		1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
			2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			4	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	MAV		5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
			6	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
			7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MC		8	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
			9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			10	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
			11	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
2	BDA		12	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	MAV		13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	MEA		14	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
	MC		15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
3	BDA		16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
	MAV		17	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
	MEA		18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
	MC		19	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	
4	BDA		20	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	
	MAV		21	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	
	MEA		22	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
	MC		23	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
5	BDA		24	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MAV		25	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	MEA		26	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MC		27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	BDA		28	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	
	MAV		29	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
	MEA		30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
	MC		31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
7	BDA		32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
	MAV		33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
	MEA		34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
	MC		35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
8	BDA		36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	MAV		37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MEA		38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	MC		39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
9	BDA		40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
			41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
	MAV		42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
			43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
			44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
MC		45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0		
		46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1		
10	BDA		47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
			48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
			49	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	MAV		50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
			51	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
			52	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
MAV		53	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0		

	MEA		54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	MC		55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	BDA		56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	MAV		57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	MEA		58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	MC		59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
11	BDA		60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	MAV		61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	MEA		62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	MC		63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
12	BDA	20-25	64	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
	MAV		65	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	MEA		66	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	BDA	15-19	67	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	MAV		68	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	MEA		69	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
	BDA	até 5	70	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1
	MAV		71	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
	MEA		72	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1
	BDA	>25	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	BDA	20-24	74	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
	MAV		75	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	MEA		76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	BDA	15-19	77	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	MAV		78	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
	MEA		79	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
BDA	10-14	80	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	
MAV		81	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
MEA		82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
13	BDA		83	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	MAV		84	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	MEA		85	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MC		86	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
	BDA		87	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	MAV		88	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
	MEA		89	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	MC		90	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	BDA		91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	MAV		92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MEA		93	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	MC		94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NOTA: As características foram avaliadas em meio BDA, MAV, MEA e MC seguindo os seguintes critérios:

1. Diâmetro médio do crescimento das colônias (cm)
2. Aspecto dos bordos da colônia: disforme (1) ou uniforme (0)
3. Esporulação: com esporulação (1) ou sem (0)
4. Aspecto do micélio: cotonoso (1) ou ralo (0)
5. Micélio sob o meio de cultura
6. Coloração do micélio : Branco
7. Coloração do micélio : Preto
8. Coloração do micélio : Verde
9. Acérvulos sobre o meio de cultura
10. Coloração do reverso da placa de Petri
11. Viscosidade do meio em função da produção de acérvulos
12. Comprimento e largura dos conídios, comprimento dos apêndices (em μm)
13. Coloração das células medianas : unicolor ou versicolor
14. Pigmento no meio de cultura