

SÔNIA ALVIM VEIGA PILEGGI

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS
DE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. POR MEIO DE MARCADORES RAPD E
SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke-Blanco
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

CURITIBA
2006

Ao meu pai,

quem me ensinou o valor da
Vida e da Natureza, a paixão
pela Ciência e o respeito pela
Universidade,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke-Blanco, pela orientação neste trabalho, e bravura no início de uma nova e importante linha de pesquisa. Espero que gere muitos frutos.

À Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel, pela co-orientação, amizade e apoio.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Vânia Aparecida Vicente e Roseli Wassem, pelas valiosas sugestões nos relatórios anuais.

À Prof^a. Dr^a. Ilma Hiroko Higuti, pelas sugestões e auxílio na identificação das bactérias endofíticas.

Ao Prof. Dr. Celso Hauer, pelo empréstimo do material para os testes de antagonismo em fungos.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Vanessa Kava-Cordeiro e Lygia Vitória Galli-Terasawa, pela amizade e ótima convivência no LabGeM.

À Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Petzl-Erler, pela disponibilidade dos equipamentos da SEAD.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética, pela agradável convivência diária, em especial ao Seu Jorge, à Marli e à Valéria.

Às funcionárias Izolde Gaertner e Shirley Rolim Cercal, pelo auxílio técnico com o material de laboratório, e pela amizade e respeito que lá cresceram.

Aos estagiários do LabGeM, Camila, Caroline, Ciça, Denny, Douglas, Eduardo, Fernanda Meira, Fernanda Tanaka, Giselle, Grasiela, Jefferson, Juliana, Luciane, Maykol, Milton, Nayara, Rafael, Sílvia, Suellen, Valéria, Vanessa, e em especial, à Sarah e à Alessandra, pela grande ajuda e amizade.

Aos alunos de Pós-graduação do LabGeM, Daniel, Danyelle, Juliana, Patrícia, Renata, Yvelise e Vanessa (Genética), André e Josiane (Microbiologia), pela excelente interação e cooperação no trabalho diário dentro do laboratório, e pela amizade e carinho que ficaram.

Aos colegas de Pós-graduação em Genética, pelos momentos difíceis, de muito estudo e dedicação, durante a obtenção dos créditos, mas muito alegres na convivência diária, em especial à turma de 2002.

Ao Prof. Dr. Baggio e à Izabel, da EMBRAPA, de Colombo, PR, pela disponibilidade das plantas de espinheira-santa para as coletas realizadas neste trabalho.

Aos funcionários dos Laboratórios de Bacteriologia e Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR, pelas linhagens referência de bactérias e fungos, gentilmente cedidas para a realização deste trabalho, em especial à Helena, à Rosângela e à Marissol.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Esmerino, do Laboratório de Microbiologia da UEPG, pelas sugestões e pelas linhagens bacterianas referência cedidas para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Irajara Borba Carneiro, do Departamento de Química da UEPG, pelo grande auxílio na elaboração dos extratos de fungos e pela disponibilidade dos equipamentos.

Ao Dalton e à Lygia, pelas linhagens referência de fungos fitopatogênicos cedidas gentilmente para este trabalho.

À querida amiga Patrícia Dalzoto, conselheira, companheira nos bons e maus momentos deste Doutorado, obrigada pela sempre pronta ajuda, paciência, por me escutar e por me ensinar; você foi e sempre será uma pessoa muito importante para mim.

Ao Marcos, por me substituir na função de mãe nos últimos 4 anos, pelo amor, compreensão, apoio, por me agüentar nas horas mais difíceis, por me ouvir e ter muita paciência, pela minha ausência. Amo e respeito muito você, por ser um pai, marido, amigo e professor maravilhoso.

Ao meu filho Matheus, que foi obrigado a se acostumar com a minha ausência, enquanto entrava na adolescência. Foi por uma grande causa, e você está incluído nela, como está em meu coração. Amo muito você, filho.

À minha mãe Maria, que me acolheu de braços abertos nestes quatro anos, de volta ao antigo lar, me apoiando nos maus momentos, se preocupando com minha saúde e de minha família, e dando todo o suporte para que eu encontrasse forças para concluir esta etapa tão importante em minha vida.

À Thelma, irmã e amiga, pelo grande apoio e disponibilidade de equipamentos e materiais, além das valiosas sugestões e conselhos sábios, a exemplo do que meu pai faria.

À minha irmã Cláudia, pelo carinho, preocupação e apoio, mesmo estando longe.

Ao meu irmão Fernando, também doutorando, que apesar da correria, sempre encontrou um tempo para se preocupar, apoiar e dar sugestões para este trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, por permitir o afastamento integral de minhas atividades para a execução deste Doutorado, e aos professores que me substituíram nas aulas nestes últimos quatro anos.

À CAPES, pelo apoio e auxílio financeiro, por meio do Programa Institucional de Capacitação Docente (PICD/UEPG), nos quatro anos de meu afastamento para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	viii
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Microrganismos endofíticos.....	4
2.1.1. Considerações gerais.....	4
2.1.2. Isolamento de endófitos.....	5
2.1.3. Ocorrência de endófitos.....	6
2.1.4. Endófitos isolados de plantas medicinais.....	8
2.1.5. Endófitos produtores de substâncias antimicrobianas.....	10
2.2. Antagonismo entre microrganismos.....	15
2.3. Espinheira-santa (<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.).....	22
2.3.1. Aspectos botânicos, ecológicos e distribuição geográfica.....	22
2.3.2. Componentes químicos e propriedades terapêuticas.....	23
2.3.3. Endófitos isolados de espinheira-santa.....	26
2.4. Marcadores moleculares do tipo RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>).....	27
2.4.1. A metodologia RAPD.....	27
2.4.2. RAPD em microrganismos endofíticos.....	29
2.4.3. RAPD em <i>Colletotrichum</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Material vegetal.....	37
3.2. Meios de cultura.....	39
3.2.1. Ágar de Batata e Dextrose (BDA).....	39
3.2.2. Meio Líquido de Batata e Dextrose (BDL).....	39
3.2.3. Ágar Sabouraud Dextrose (SDA).....	39
3.2.4. Caldo de Extrato de Malte (MEB).....	40
3.2.5. Meio Seletivo para Isolamento de Actinomicetos (AC).....	40
3.2.6. Ágar Nutriente (NA).....	40
3.2.7. Ágar Müeller Hinton (MHA).....	41
3.2.8. Caldo Nutriente (NB).....	41
3.2.9. Meio Completo (MC).....	41
3.2.10. Meio Completo Líquido (MCL).....	41
3.2.11. Ágar Müeller Hinton 0,85%.....	42
3.3. Soluções e tampões.....	42
3.3.1. Clorofil.....	42
3.3.2. Clorofane.....	42

3.3.3. Benomyl	43
3.3.4. Lactofenol Azul de Algodão	43
3.3.5. Gel de Agarose (0,8%)	43
3.3.6. Gel de Agarose (1,5%)	43
3.3.7. RNase	43
3.3.8. Solução de Brometo de Etídio	44
3.3.9. Tampão da Amostra (6X)	44
3.3.10. Tampão de Corrida TBE 10X pH 8,0	44
3.3.11. Solução de Glicerol 20%	44
3.3.12. Tampão de Extração de DNA (TE)	44
3.3.13. Tampão Tris-EDTA (TE)	45
3.3.14. Solução Estoque de Tetraciclina	45
3.3.15. Solução Estoque de Nistatina	45
3.3.16. Solução Estoque de Ciclohexamida	45
3.3.17. Solução Estoque de Ácido Nalidíxico	45
3.3.18. Solução de Vitaminas	46
3.3.19. Solução de <i>Tween 80</i> a 0,1% (v/v)	46
3.3.20. Solução Salina a 0,85%	46
3.4. Métodos	46
3.4.1. Isolamento dos microrganismos endofíticos	46
3.4.2. Identificação dos microrganismos endofíticos	49
3.4.3. Antagonismo dos isolados endofíticos contra os microrganismos patogênicos	50
3.4.3.1. Atividade antifúngica em meio sólido	50
3.4.3.2. Atividade antibacteriana em meio sólido	52
3.4.3.3. Atividade antibacteriana por bioautografia	54
3.4.3.3.1. Fermentação líquida dos extratos brutos dos fungos	54
3.4.3.3.2. Bioautografia em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) pelo método <i>agar-overlay</i>	55
3.4.4. Obtenção de colônias monospóricas	56
3.4.5. Extração de DNA	56
3.4.6. Análise da variabilidade genética por RAPD	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Isolamento de microrganismos endofíticos de espinheira-santa	59
4.1.1. Isolamento e identificação de fungos endofíticos	61
4.1.2. Isolamento e identificação de bactérias endofíticas	68
4.3. Estudo do antagonismo dos isolados contra patógenos	71
4.3.1. Atividade antifúngica em meio sólido	73
4.3.2. Atividade antibacteriana em meio sólido	86
4.3.3. Bioautografia em cromatografia de camada delgada (CCD) pelo método <i>agar-overlay</i>	96
4.4. Caracterização morfológica e molecular de isolados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp.	97
5. CONCLUSÕES	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Épocas do ano, órgãos da planta, condições de incubação e nº. de fragmentos plaqueados nas sete coletas de endófitos de espinheira-santa	47
TABELA 2: Linhagens referência de fungos patogênicos utilizados nos testes de atividade antifúngica e suas características de patogenicidade, procedência e condições de incubação.....	50
TABELA 3: Linhagens referência utilizadas nos testes de atividade antibacteriana	53
TABELA 4: Porcentagem de microrganismos endofíticos isolados de espinheira-santa em sete períodos de coleta	59
TABELA 5: Número de isolados de fungos endofíticos pertencentes a 6 gêneros e 13 grupos morfológicamente distintos, a partir de folhas, pecíolos e sementes de espinheira-santa (<i>Maytenus ilicifolia</i>).....	63
TABELA 6: Morfotipos das bactérias endofíticas isoladas de sementes de espinheira-santa	69
TABELA 7: Microrganismos endofíticos de espinheira-santa selecionados para os testes de antagonismo contra fungos patógenos humanos e de plantas.	72
TABELA 8: Resultados dos testes de antagonismo de 15 endófitos isolados de espinheira-santa contra 6 patógenos ensaiados, que formaram halos de inibição	89
TABELA 9: Resultados dos testes de antagonismo de 22 endófitos isolados de espinheira-santa contra 6 patógenos ensaiados, que apresentaram potencial para controle biológico	90
TABELA 10: Identificação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> sp. baseada nas análises moleculares de RAPD e ITS ¹ , medidas do tamanho dos conídios e presença de ascos e ascósporos em lâminas de microcultivo.....	102
TABELA 11: <i>Primers</i> selecionados e suas respectivas seqüências de nucleotídios.....	102
TABELA 12: AMOVA – Análise de Variância de Marcadores Moleculares	107
TABELA 13: Diferença média entre os grupos e subgrupos obtidos na AMOVA.....	108

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A - Aspecto do arbusto de espinheira-santa; B – Aspecto do fruto tipo cápsula da espinheira-santa; C – Folhas e frutos maduros (deiscentes) de <i>M. ilicifolia</i> ; D - Aspecto da semente de <i>M. ilicifolia</i>	24
FIGURA 2: Croqui da área experimental de espinheira-santa no Centro Nacional de Pesquisas de Floresta (CNPFF), EMBRAPA, Colombo, PR.....	38
FIGURA 3: Macromorfologia dos fungos patogênicos utilizados nos testes de atividade antifúngica.....	51
FIGURA 4: Porcentagem de microrganismos endofíticos isolados de espinheira-santa em cada isolamento.....	60
FIGURA 5: Macro e micromorfologia de <i>Alternaria</i> sp., isolado AD99.....	64
FIGURA 6: Macro e micromorfologia de <i>Bipolaris</i> sp., isolado FV123.....	64
FIGURA 7: Macro e micromorfologia de <i>Cladosporium</i> sp., isolado AV165.....	65
FIGURA 8: Macro e micromorfologia de <i>Pestalotiopsis</i> sp., isolado SD07.....	65
FIGURA 9: Macro e micromorfologia de <i>Colletotrichum</i> sp., isolado COL13.....	66
FIGURA 10: Macro e micromorfologia de <i>Phyllosticta capitalensis</i> (<i>Guignardia mangiferae</i>), isolado 79.....	66
FIGURA 11: Macromorfologia dos grupos de fungos endofíticos isolados de espinheira-santa em diferentes meios de cultura, pH e período de crescimento.....	67
FIGURA 12: Macromorfologia de cinco morfotipos de bactérias isoladas de espinheira-santa.....	70
FIGURA 13: Antagonismo contra o fungo patogênico de milho <i>Fusarium</i> sp., linhagem I51-2; halo de inibição frente ao fungo endofítico FV113.....	74
FIGURA 14: Antagonismo contra o fungo patogênico de milho <i>Fusarium</i> sp., linhagem I51-2; halo de inibição frente ao fungo endofítico FAC32.....	74
FIGURA 15: Antagonismo contra o fungo patogênico de milho <i>Fusarium</i> sp., linhagem I51-2; halo de inibição frente à bactéria endofítica S1.....	75
FIGURA 16: Antagonismo contra o fungo patogênico de milho <i>Fusarium</i> sp., linhagem I51-2; halo de inibição frente às bactérias endofíticas S4 e S24.....	75
FIGURA 17: Antagonismo contra o fungo patogênico de café <i>Trichoderma</i> sp., linhagem CNBP ₂ F ₁₆ , halo de inibição frente ao fungo endofítico <i>Bipolaris</i> sp.....	77
FIGURA 18: Antagonismo contra o fungo patogênico de café <i>Trichoderma</i> sp., linhagem CNBP ₂ F ₁₆ ; halo de inibição frente a SD26.....	77
FIGURA 19: Antagonismo contra o fungo patogênico de café <i>Trichoderma</i> sp., linhagem CNBP ₂ F ₁₆ ; halo de inibição frente ao fungo isolado de semente SV05.....	78
FIGURA 20: Antagonismo contra o fungo <i>Guignardia citricarpa</i> , agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição na presença do endófito <i>Cladosporium</i> sp. 79	

FIGURA 21: Antagonismo contra o fungo <i>Guignardia citricarpa</i> , agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição na presença do endófito AV106, não identificado	80
FIGURA 22: Antagonismo contra o fungo <i>Guignardia citricarpa</i> , agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição na presença de FD90, não identificado	80
FIGURA 23: Antagonismo contra o fungo <i>Guignardia citricarpa</i> , agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição do crescimento do patógeno na presença do endófito FV113, não identificado	81
FIGURA 24: Antagonismo contra o fungo <i>Guignardia citricarpa</i> , agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição na presença de FV138, fungo não identificado	81
FIGURA 25: Antagonismo contra o fungo <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , linhagem Fp18, causadora da cromoblastomicose em humanos; inibição do crescimento do patógeno diante do endófito FD90, não identificado	82
FIGURA 26: Antagonismo contra o fungo <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , linhagem Fp18, causadora da cromoblastomicose em humanos; inibição frente ao endófito FV127, não identificado	82
FIGURA 27: Teste de volatilidade de substâncias antimicrobianas entre os fungos FV113 e <i>Fusarium</i> sp. I51-2, mostrando inibição de crescimento do patógeno em relação ao controle sem o endófito apenas devido ao pareamento e não por substâncias voláteis.	84
FIGURA 28: Teste de volatilidade de substâncias antimicrobianas entre os fungos FV113 e <i>Fusarium</i> sp. I51-2; nota-se o início da formação do halo de inibição de crescimento do patógeno em relação ao controle sem o endófito apenas devido ao pareamento e não por substâncias voláteis.....	84
FIGURA 29: Teste de volatilidade de substâncias antimicrobianas entre os fungos FV113 e <i>Guignardia citricarpa</i> PC13, observando-se mudanças na coloração do pigmento produzido pelo endófito	85
FIGURA 30: Teste de volatilidade de substâncias antimicrobianas entre os fungos FD90 e <i>Guignardia citricarpa</i> PC13, observando-se alterações na morfologia da colônia.....	85
FIGURA 31: Halo de inibição produzido por <i>Alternaria</i> sp. (AD99), na presença de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341.....	86
FIGURA 32: Halo de inibição produzido pelo isolado FV113 na presença de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	87
FIGURA 33: Halo de inibição produzido por <i>Pestalotiopsis</i> sp. (SD07), na presença de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	87
FIGURA 34: Pareamento frente ao fungo patogênico de milho <i>Fusarium</i> sp., linhagem I51-2, mostrando o potencial dos isolados FV32 (A) e SV03 (B) para controle biológico ..	91
FIGURA 35: Pareamento frente ao fungo patogênico de café <i>Trichoderma</i> sp., linhagem CNBP ₂ F ₁₆ , mostrando o potencial dos isolados FV28 (A) e FV143 (B) para controle biológico	91
FIGURA 36: Pareamento frente ao fungo patogênico de <i>Citrus</i> , <i>Guignardia citricarpa</i> , linhagem PC3C, mostrando o potencial dos isolados AV70 (A) e FD75 (B) para controle biológico	92

FIGURA 37: Pareamento frente ao fungo patogênico de <i>Citrus</i> , <i>Guignardia citricarpa</i> , linhagem PC3C, mostrando o potencial dos isolados FV28 (A) e SD01 (B) para controle biológico.	92
FIGURA 38: Pareamento frente ao fungo patogênico de <i>Citrus</i> , <i>Guignardia citricarpa</i> , linhagem PC13, mostrando o potencial do isolado FV28 para controle biológico; em (A) pareamento após 7 dias e em (B) após 14 dias.	93
FIGURA 39: Pareamento frente ao fungo patogênico de <i>Citrus</i> , <i>Guignardia citricarpa</i> , linhagem PC13, mostrando o potencial do isolado AV70 para controle biológico; em (A) verso das placas com pareamento após 14 dias e em (B) frente.	93
FIGURA 40: Pareamento frente ao fungo patogênico de <i>Citrus</i> , <i>Guignardia citricarpa</i> , linhagem PC13, mostrando o potencial dos isolados FV136 (A) e COL10 (B) para controle biológico.	94
FIGURA 41: Pareamento frente à levedura <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, mostrando o potencial biotecnológico dos isolados FV112 (A) e SV03 (B).	94
FIGURA 42: Pareamento frente ao fungo patogênico humano <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , linhagem Fp18, mostrando o potencial biotecnológico dos isolados COL13 (A) e SV03 (B).	95
FIGURA 43: Pareamento frente ao fungo patogênico humano <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , linhagem Fp18, mostrando alterações na morfologia da colônia provocadas pela presença do isolado SD26, comparando-se com o controle sem o endofítico.	95
FIGURA 44: Bioautografia em cromatografia de CCD pelo método <i>agar overlay</i>	96
FIGURA 45: Aspecto macroscópico das colônias monospóricas de <i>Colletotrichum</i> sp., endófitos de folhas de espinheira-santa, utilizadas para o estudo da variabilidade genética por meio de RAPD.	98
FIGURA 46: Fotomicrografia de esclerócio da linhagem COL7 e a presença de conídios e seta (400X).	99
FIGURA 47: Fotomicrografia de apressórios e conídios da linhagem COL8 (400X).	99
FIGURA 48: Fotomicrografia de esclerócio da linhagem COL3 e a presença de conídios e setas(100X).	100
FIGURA 49: Fotomicrografia de apressórios e conídios da linhagem COL2 (400X).	100
FIGURA 50: Fotomicrografia de ascos com ascósporos da linhagem COL1 (400X).	101
FIGURA 51: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i> sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o <i>primer</i> OPB-08.	103
FIGURA 52: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i> sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o <i>primer</i> OPQ-04.	104
FIGURA 53: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i> sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o <i>primer</i> OPX-13.	104
FIGURA 54: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i> sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o <i>primer</i> OPX-17.	105
FIGURA 55: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i> sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o <i>primer</i> OPZ-19.	105

FIGURA 56: Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética de 16 isolados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> sp. por meio de marcadores RAPD	106
FIGURA 57: Análise de componentes principais da similaridade genética entre as linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i> sp. isoladas de espinheira-santa	107

RESUMO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. POR MEIO DE MARCADORES RAPD E SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO

Autora: Sônia Alvim Veiga Pileggi

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke-Blanco

Foram isolados microrganismos endofíticos de folhas, pecíolos e sementes da planta medicinal espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.), com o objetivo de investigar o seu potencial farmacológico. As coletas foram realizadas em diferentes períodos do ano e as condições de isolamento variaram de acordo com a temperatura de incubação das placas, tipo, composição e pH dos meios de cultura utilizados, bem como o número de fragmentos plaqueados. No total, foram isolados 915 endófitos de diferentes tecidos da planta, entre eles 793 fungos filamentosos, 1 actinomiceto e 121 bactérias. Nos isolamentos de folhas e pecíolos, os fungos filamentosos foram mais freqüentes do que as bactérias. Já em sementes ocorreu o inverso, sendo predominante o isolamento de bactérias. Considerando as características morfológicas das colônias e a observação de microcultivo em microscópio ótico, foi possível sugerir a identificação de alguns isolados de fungos ao nível de gênero. Em folhas de espinheira-santa, os gêneros isolados com maior freqüência foram: *Alternaria* sp. (28%), *Colletotrichum* sp. (6,1%), *Bipolaris* sp. (3,2%), *Phyllosticta* sp. (1,6%) e *Cladosporium* sp. (1,1%); em pecíolos, os gêneros *Alternaria* sp. (9,5%) e *Cladosporium* sp. (4,7%), e em sementes *Cladosporium* sp. (13,3%) e *Pestalotiopsis* sp. (10%). Cerca de 60% dos isolados fúngicos não produziram estruturas de reprodução em meio de cultura, nas condições utilizadas neste trabalho, e, portanto não puderam ser identificados. No entanto, foram agrupados segundo características macroscópicas em outros 13 grupos. Pode-se perceber a predominância do grupo I entre os fungos isolados de sementes de espinheira-santa. Tal grupo é composto por fungos de micélio algodinoso, de coloração branca e taxa rápida de crescimento. O mesmo grupo foi também o mais freqüente nos isolamentos de folhas e pecíolos, reforçando a

natureza endofítica dos isolados. Dentro deste grupo, três isolados puderam ser identificados como *Pestalotiopsis* sp. (SD01, SD07 e SV12), gênero freqüentemente citado na literatura como produtor de compostos bioativos. Foram isoladas 42 bactérias endofíticas nos quatro isolamentos de folhas, 6 de pecíolos e 73 nos dois isolamentos de sementes, totalizando 121 endófitos. Estes foram agrupados em seis morfotipos, baseados em características macroscópicas e coloração de Gram. Observou-se maior proporção de isolamento de bacilos Gram negativos de coloração rosada. Foram selecionados 39 fungos e 70 bactérias para testes de antagonismo contra fungos patógenos humanos e de plantas e contra linhagens bacterianas de referência. Apenas 15 endófitos promoveram a formação de halo contra algum patógeno ensaiado. Outros 21, apesar de não promoverem a formação de halo de inibição, apresentaram um potencial para controle biológico. Foram selecionados 16 isolados de *Colletotrichum* para caracterização morfológica e molecular por marcadores RAPD, objetivando a identificação ao nível de espécie e a análise da magnitude da variabilidade genética destes endófitos. Foram utilizados dez primers de RAPD, gerando 188 bandas polimórficas. A análise destes marcadores RAPD pelo software NTSYS (coeficiente Jaccard) com o agrupamento pelo método UPGMA permitiu a construção de um dendrograma de similaridade genética. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) realizada sugere a existência de pelo menos 2 grupos de fungos geneticamente diferentes, sendo o primeiro subdividido em 3 sub-grupos. Sugere-se o isolamento de pelo menos 2 espécies de *Colletotrichum* neste trabalho (grupos I e II). Resultados preliminares do seqüenciamento de região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA sugerem que o isolado COL13 (grupo II) pertença à espécie *Glomerella cingulata* (anamorfo: *Colletotrichum gloeosporioides*) e que o isolado COL6 (subgrupo Ib) corresponda à espécie *Colletotrichum boninense*.

Palavras-chave: endofíticos, *Maytenus*, espinheira-santa, antagonismo, RAPD

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS OF *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. BY RAPD MARKERS AND PHARMACOLOGICAL POTENCIAL

Author: Sônia Alvim Veiga Pileggi

Advisor: Prof. Dr. Chirlei Glienke-Blanco

Endophytic microorganisms were isolated from leaves, stems, and seeds of the medicinal plant “holly spine” (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.), in order to investigate their pharmacological potential. Different times of year and incubation conditions were used, like temperature, media composition, and pH, as well as the amount of fragments per plate. Among all 915 isolated endophytes, there were 793 filamentous fungi, 1 actinomycete, and 121 bacteria. Filamentous fungi were more frequent when isolated from leaves and stems, and bacteria from seeds. Some genera of fungi endophytes were suggested, after morphological and microscopic data. *Alternaria* sp. (28%), *Colletotrichum* sp. (6.1%), *Bipolaris* sp. (3.2%), *Phyllosticta* sp. (1.6%), and *Cladosporium* sp. (1.1%) were more frequent in leaves; *Alternaria* sp. (9.5%) and *Cladosporium* sp. (4.7%) in stems; and *Cladosporium* sp. (13.3%) and *Pestalotiopsis* sp. (10%) in seeds. About 60% of isolated fungi had no reproductive structures in culture media, and could not be identified. According to macroscopic morphology, there were 13 different groups of unidentified fungi. Group I, with fluffy or granulated, white, and fast growing mycelia was predominant in seeds. This group was the most frequent in stems and seeds as well. Three isolates of this group were identified as *Pestalotiopsis* sp. (SD01, SD07, and SV12), which genus has often been cited as bioactive compounds producer. Among bacteria, 42 were isolated from leaves, 6 from stems, and 73 from seeds, totalizing 121 endophytes. They were divided in six groups, based on colony macroscopic features and Gram staining. Gram-negative reddish bacteria were most frequently isolated from tissues of “holly spine”. In order to develop antagonism bioassays, 39 fungi and 70 bacteria were selected for tests against

reference plant and human pathogenic fungi as well as reference bacteria strains. Only 15 endophytes induced inhibition halo against tested pathogens, while other 21 showed to be potentially biological controllers. For morphological and molecular characterization by RAPD markers, 16 isolates of *Colletotrichum* sp. were selected, with the purpose of species identification and genetic variability analysis of these endophytes. Ten RAPD primers were used, producing 188 polymorph bands. Analysis by NTSYS software (Jaccard coefficient) using UPGMA grouping method originated a dendrogram of genetic similarity. AMOVA suggested the existence of at least two species of *Colletotrichum* in this study (groups I and II). Preliminary data of rDNA ITS1-5,8S-ITS2 region sequencing suggested isolate COL13 (group III) as *Glomerella cingulata* (anamorf: *Colletotrichum gloeosporioides*), and isolate COL6 (subgroup Ib) as *Colletotrichum boninense*.

Key words: endophytes, *Maytenus*, holly spine, antagonism, RAPD

1. INTRODUÇÃO

A espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.) é uma planta da família Celastraceae, utilizada na Medicina Popular principalmente no tratamento de úlcera e outras afecções gástricas, devido à produção de certos compostos químicos, como triterpenos e polifenóis. Também é conhecida como cancorosa, cancerosa, espinho de Deus, salva-vidas, entre outras denominações, dependendo da localização geográfica. Ocorre principalmente no Sul do Brasil e em outros países sulamericanos, como Uruguai, Paraguai, Bolívia, Argentina e Chile. Em certas tribos indígenas e populações rurais do Paraguai e da Bolívia, é considerada ainda um agente regulador da fertilidade, propriedade atribuída ao alcalóide maitesina (CORDEIRO; VILEGAS; LANÇAS, 1999).

No interior dos vegetais superiores investigados até o momento coabitam diversos microrganismos, denominados endofíticos, pelo menos durante um período do ciclo de vida da planta, aparentemente sem lhes causar doença (PETRINI, 1991). Em plantas medicinais não é diferente, podendo ser facilmente isolados em meios de cultivo simples. Os endófitos têm sido descritos como protetores contra o ataque de outros microrganismos, insetos, e animais herbívoros, devido à produção de toxinas. Podem ainda produzir fitormônios, enzimas e outros compostos químicos, oferecendo vantagens à planta hospedeira, enquanto se desenvolvem em seu interior. No entanto, sob condições de estresse, podem tornar-se patogênicos (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000).

Estudos sobre a potencialidade dos microrganismos endofíticos, principalmente os relacionados à descoberta de novas substâncias, mostram-se relevantes tanto para uso no controle biológico de doenças e pragas, como para aplicação no setor biotecnológico ou indústria farmacêutica. Os antibióticos são um exemplo, considerando a atual escassez na fonte de matéria prima alternativa para a sua produção, e o problema do aumento da resistência bacteriana às drogas utilizadas no tratamento de infecções em humanos. Plantas medicinais apresentando ação antimicrobiana poderiam ser hospedeiras de endófitos, que

por sua vez poderiam apresentar tais propriedades, sugerindo que na verdade o princípio ativo antimicrobiano pode ser produzido pelo microrganismo e não propriamente pelo vegetal, ou então que seus efeitos terapêuticos somente sejam constatados devido à estreita associação planta-hospedeiro. Um exemplo é o taxol, utilizado para o tratamento de câncer, presente tanto na planta medicinal *Taxus brevifolia*, como no fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al., 1995).

Na literatura encontram-se algumas referências de estudos envolvendo microrganismos endofíticos isolados de plantas medicinais, mas poucas de espinheira-santa, a qual apresenta alto potencial farmacológico. Desta forma, justifica-se o interesse em elucidar aspectos da biologia destes microrganismos, para compreender melhor a sua relação com a planta hospedeira e seu papel na produção de novos fármacos.

Com a mesma importância, estudos moleculares têm sido conduzidos, buscando uma análise mais direta do material genético destes microrganismos tão peculiares. Uma das técnicas de grande auxílio nas pesquisas genéticas é a utilização de marcadores moleculares do tipo RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, baseada na amplificação de fragmentos aleatórios, por meio de PCR. A técnica de RAPD permite de forma rápida e relativamente barata a avaliação da diversidade genética entre indivíduos ao nível de DNA.

Com base no exposto, o presente trabalho objetivou:

- a) Isolar bactérias, actinomicetos, leveduras e fungos filamentosos do interior de tecidos aparentemente sadios de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (espinheira-santa);
- b) Identificar os principais gêneros de microrganismos endofíticos isolados;
- c) Verificar a ocorrência de antagonismo de alguns isolados de cada gênero identificado, bem como dos grupos não identificados, selecionados ao acaso e ensaiados frente a patógenos de plantas e de humanos;

- d) Testar a atividade antibacteriana de alguns isolados de cada gênero identificado, bem como dos grupos não identificados, selecionados ao acaso e ensaiados frente a linhagens bacterianas de referência;
- e) Caracterizar a variabilidade genética de isolados endofíticos de *Colletotrichum* sp., por meio de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), considerando o relato na literatura do potencial farmacológico inerente a este gênero.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Microrganismos endofíticos*

2.1.1. Considerações gerais

O termo endófito foi mencionado pela primeira vez no início do século XIX, para definir todos aqueles organismos que colonizam tecidos internos de plantas, mas foi De Bary, em 1866, quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas (AZEVEDO, 1998). CARROLL (1986) restringiu o uso do termo endófito a organismos que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, excluindo os fungos patogênicos e mutualistas, tais como micorrizas. PETRINI (1991) propôs a expansão da definição de Carroll, incluindo todos os organismos que habitam órgãos de plantas que, em algum período do seu ciclo de vida, colonizam tecidos internos da planta, sem causar dano aparente a seu hospedeiro. De acordo com este autor, estariam sendo considerados aqueles endófitos que apresentam uma fase epifítica um tanto longa, bem como patógenos latentes que podem viver assintomaticamente em seus hospedeiros por algum tempo em seu ciclo de vida.

Os microrganismos endofíticos foram considerados assintomáticos, ou seja, sem produzir efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, até o final da década de 70. Porém, estudos posteriores revelaram propriedades de interesse, como proteção contra predadores e patógenos. Atualmente, atribuem-se outras características importantes a estes organismos, como o aumento da resistência a condições de estresse, alteração em propriedades fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, fármacos (como antibióticos), imunossuppressores, antitumorais, e compostos de interesse biotecnológico, como enzimas (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002; SUTO et al., 2002; STROBEL, 2003).

Alguns autores sugerem que certos fungos endofíticos produzem compostos igualmente presentes em suas plantas hospedeiras, como algumas enzimas (celulases e ligninases) em *Xylaria* sp., fatores de crescimento como a giberelina em *Fusarium moniliforme*, substâncias antitumorais como o taxol em *Taxomyces andreanae*, entre outros. Tudo parece indicar uma transposição de genes entre plantas e fungos em uma verdadeira engenharia genética *in vivo*. Se esses casos forem confirmados, ficará evidente que vegetais e fungos transgênicos podem ocorrer naturalmente pela transferência de genes entre espécies pertencentes a diferentes reinos (AZEVEDO, 1998).

2.1.2. Isolamento de endófitos

Os microrganismos endofíticos podem ser detectados no interior de tecidos vegetais por meio de microscopia ótica (WHITE Jr.; MORGAN-JONES; MORROW, 1993) ou eletrônica (VIRET; PETRINI, 1994), ou ainda por métodos sorológicos (SINCLAIR, 1991). A infecção dá-se por meio de fissuras e a colonização ocorre nos espaços intercelulares, abaixo das camadas de células epidermais, dificilmente sendo observada penetração nas células em condições naturais (STROBEL, 2003).

O processo de isolamento de endófitos envolve cuidados especiais para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, os epífitos. A desinfestação da superfície das folhas, caules e outros órgãos vegetais é uma etapa fundamental para o adequado isolamento destes microrganismos. Os tempos de tratamento e a concentração do agente desinfetante podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, razão pela qual devem ser feitos testes preliminares para a adequação da metodologia de isolamento, para que apenas os microrganismos epifíticos, mas não os endofíticos sejam eliminados (BLANCO, 1999).

Os meios de cultura devem ser apropriados, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar, podendo ser acrescentadas substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias, ou fungicidas, que

restringem o crescimento de fungos. Também podem ser utilizados meios específicos que permitem o crescimento de apenas um determinado tipo de microrganismo que se deseja isolar em particular. É o caso do meio seletivo para o isolamento de actinomicetos (meio AC), de KÜSTER e WILLIAMS (1964), empregado no presente trabalho com o objetivo específico de isolar este grupo de microrganismos, por serem citados com freqüência na literatura como produtores de compostos bioativos. Outras variáveis igualmente importantes devem ser levadas em consideração, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e a época da coleta, a temperatura de incubação das placas para o isolamento, além da recorrência do isolado, revelando o seu verdadeiro estado endofítico (PETRINI, 1991; AZEVEDO, 1998).

2.1.3. Ocorrência de endófitos

Provavelmente todas as plantas apresentam em seu interior microrganismos endofíticos, até mesmo diversas espécies em um único hospedeiro. Algumas são mais freqüentes em determinado tipo de vegetal, designadas dominantes, em contraposição a outras mais raras, chamadas de secundárias. Em alguns casos, constata-se uma especificidade endofito-hospedeiro, em que poucas espécies de fungos são encontradas, enquanto na maioria dos casos, como em *Stylosanthes* e *Musa*, uma variedade enorme de gêneros e espécies é observada (PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; GLIENKE, 1995; AZEVEDO, 1998).

A ocorrência de endófitos varia bastante de acordo com o clima da região onde foi realizado o isolamento. A maioria dos estudos descreve a microbiota de vegetais isolados de regiões de clima temperado, que se revela bastante diversa das espécies encontradas em regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (RODRIGUES; PETRINI, 1997).

Os principais ou mais freqüentes grupos, gêneros e espécies de microrganismos endofíticos têm sido descritos em vários trabalhos nos últimos dez anos, alguns deles apresentando extensas revisões sobre o assunto, nos mais

diversos aspectos. Os fungos predominam em número de trabalhos na literatura científica, seguidos de bactérias e actinomicetos, não por isso menos importantes (PETRINI, 1991; FISHER; PETRINI; LAPPIN SCOTT, 1992; CHANWAY, 1996; HALLMANN et al., 1997; RODRIGUES; PETRINI, 1997; AZEVEDO, 1998; OKANE; NAKAGIRI; ITO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STROBEL, 2002; STROBEL, 2003).

O gênero *Colletotrichum* tem sido frequentemente isolado como endófito em uma variedade enorme de plantas.

ARAÚJO et al. (2001) observaram maior abundância de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia citricarpa* e *Cladosporium* sp. entre os isolados endofíticos de folhas e porta-enxertos de *Citrus*.

BUSSABAN et al. (2001) isolaram fungos endofíticos de folhas, pseudocaulas e rizomas de gengibre (*Amomum siamense* Criab.), coletados em dois locais na Tailândia. *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella* spp., *Xylaria* spp. e *Phomopsis* spp. foram os endófitos dominantes.

CAMATTI-SARTORI et al. (2005) isolaram fungos endofíticos de folhas, flores e frutos de macieiras (*Malus domestica*) no sul do Brasil, de três sistemas de cultivo diferentes, convencional, integrado e orgânico, durante dois ciclos vegetativos. O cultivo orgânico proporcionou um maior número de isolados quando comparado ao integrado e convencional, e os gêneros mais frequentes foram *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Botryosphaeria*, entre os fungos filamentosos, e *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus*, entre as leveduras.

PHOTITA et al. (2005) coletaram 34 isolados de *Colletotrichum* spp. de banana, gengibre, soja, manga, *Euphatorium thymifolia* e *Draceana sanderiana*, identificados e agrupados de acordo com a morfologia da colônia, tamanho e formato de apressórios e conídios, bem como análise molecular baseada em seqüências ITS de rDNA.

RUBINI et al. (2005) isolaram a comunidade de fungos endofíticos de plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.) resistentes e suscetíveis ao agente causal da vassoura da bruxa, o basidiomiceto *Crinipellis pernicioso*. Os endófitos foram

identificados por características morfológicas e seqüenciamento de rDNA como pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia*, *Monilochoetes*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pleurotus*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma*, *Verticillium* e *Xylaria*. Os autores identificaram ainda alguns endófitos potencialmente antagonistas, destacando-se *Gliocladium catenulatum*, que reduziu em 70% a incidência da vassoura da bruxa *in vivo* em plântulas de cacaueteiro.

SANTAMARIA e BAYMAN (2005) compararam comunidades de fungos epifíticos e endofíticos associadas com folhas de café (*Coffea arabica*) em Porto Rico. Foram isolados 821 microrganismos agrupados em 131 morfoespécies. *Pestalotia* e *Botryosphaeria* foram os gêneros mais comuns entre os epifíticos, enquanto *Colletotrichum*, *Xylaria*, e *Guignardia* foram isolados com maior frequência entre os endófitos. *Guignardia* não foi isolado como epifítico, apenas como endófito. Os autores observaram que fragmentos de folha com *Colletotrichum* são menos prováveis de conter *Xylaria* e *Guignardia* do que os sem *Colletotrichum*, sugerindo a possibilidade de competição ou antagonismo entre os endófitos, ou seja, *Xylaria* pode estar restringindo o crescimento de *Colletotrichum*, importante patógeno de muitas plantas.

2.1.4. Endófitos isolados de plantas medicinais

Os microrganismos endofíticos também são encontrados em muitas espécies de plantas medicinais.

Em 1995, STIERLE et al. relataram a presença do fungo *Taxomyces andreanae*, endófito produtor de taxol e outros taxanos, que vive no interior da planta medicinal *Taxus brevifolia*, utilizada para o tratamento de câncer.

LU et al. (2000) caracterizaram três novos metabólitos antimicrobianos de uma cultura do fungo *Colletotrichum* sp., endófito isolado da planta medicinal

Artemisia annua L. (Asteraceae), produtora de artemisinina, droga antimalárica muito utilizada na China.

RODRIGUES, HESSE e WERNER (2000) isolaram os fungos endofíticos *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* da planta medicinal *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). CORRADO e RODRIGUES (2004) isolaram o fungo *Phomopsis* sp. de pecíolos da mesma planta e de folhas de outra planta medicinal, a *Aspidosperma tomentosum*.

WANG et al. (2000) isolaram o fungo endofítico *Tubercularia* sp., linhagem TF5, da planta medicinal *Taxus mairei*, coletada na província de Fujian, sudeste da China. Os autores estudaram a atividade anticancerígena do taxol, um diterpeno produzido pela linhagem TF5, que interfere no processo de divisão celular, prevenindo a despolimerização da tubulina. Os resultados mostraram uma alta citotoxicidade *in vitro* diante de linhagens celulares cancerosas KB (carcinoma humano de epiderme) e P388 (leucemia em ratos). Por meio de técnicas de imunofluorescência e microscopia eletrônica, observaram resultados similares sobre o mecanismo de ação do taxol autêntico (extraído da planta *Taxus* sp.), comparando-se com o taxol produzido pelo endófito, como aumento da estabilidade dos microtúbulos e indução da polimerização da tubulina.

ZOU et al. (2000) isolaram um fungo endofítico da planta *Artemisia mongolica* (Fisch. ex Bess.), da família Asteraceae, identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., que produziu uma substância antimicrobiana chamada ácido coletótrico.

MAGALHÃES (2001) isolou endófitos de folhas e segmentos nodais de *Himatanthus siccuba* Spruce (wood), espécie medicinal nativa da Região Amazônica pertencente à família Apocynaceae, cujo látex é utilizado como agente antitumoral, antiinflamatório, antifúngico, vermífugo e antianêmico. Foram encontrados e identificados os seguintes gêneros: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Glomerella*, *Pestalotia* e *Xylaria*. O gênero *Guignardia* foi escolhido para o estudo da variabilidade genética, por se tratar de um endófito freqüente em hospedeiros tropicais e potencialmente útil na triagem de microrganismos produtores de metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Um total de 50

isolados de *Guignardia* sp. foram utilizados sendo 30 isolados de *H. sucuuba* pertencentes a área da Reserva Florestal do Campus Universitário, 10 da Reserva Florestal Adolpho Ducke e 10 pertencentes a outros hospedeiros (*Copaifera multijuga* Hayne, *Paullinia cupana* var. *sorbilis* e *Palicourea marcgravii* St. Hill). Utilizando-se 12 *primers* foram obtidos 137 marcadores polimórficos. Uma análise de agrupamento por UPGMA utilizando o coeficiente de Jaccard e o programa NTSYS revelou agrupamentos por localização geográfica. A análise de *bootstrap* evidenciou a existência de populações bastante homogêneas nas áreas da Reserva do Campus Universitário e da Reserva Ducke, com exceção dos isolados C103, C106, D01, COP 03 e PM 02 que apresentaram maior distância genética em relação aos demais. Por meio da AMOVA (análise da variância molecular) os autores constataram que mais de 80% da variabilidade genética estava contida dentro das populações.

SHRESTHA et al. (2001) constataram a produção de paclitaxel pelos fungos endofíticos *Sporormia minima* e *Trichothecium* sp., isolados da planta medicinal *Taxus wallichiana*, da região do Nepal, Índia.

GAO et al. (2005) avaliaram uma comunidade de fungos endofíticos de *Heterosmilax japonica* Kunth., planta medicinal reconhecida na China por seus efeitos diuréticos, por meio de análises moleculares de RFLP e ITS de rDNA. Os autores observaram uma grande variedade de fungos colonizando o interior das plantas, entre eles *Mycosphaerella*, *Phomopsis*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Glomerella*, *Botryosphaeria* e *Guignardia*. Os autores verificaram maior abundância de populações endofíticas em amostras coletadas na primavera do que no verão, constatando uma flutuação sazonal para os endófitos de *H. japonica*.

2.1.5. Endófitos produtores de substâncias antimicrobianas

PELÁEZ et al. (1998) isolaram 152 espécies de fungos endofíticos de nove espécies de plantas, incluindo medicinais, provenientes de regiões de solo salino e calcáreo da Espanha. Foram investigadas 187 linhagens de 136 espécies

diferentes de fungos quanto à produção de antimicrobianos, frente a bactérias e leveduras, algumas de interesse clínico. Do total de 187, 45 (24%) linhagens, pertencendo a 37 (27%) espécies diferentes, revelaram-se produtoras de compostos antimicrobianos, mais frequentemente antibacterianos (84,4%). Os autores detectaram grandes diferenças na capacidade de produzir metabólitos com atividade antimicrobiana entre os isolados, inclusive dentro da mesma espécie de fungo.

ARAÚJO, SILVA e AZEVEDO (2000) obtiveram 53 endófitos do grupo dos actinomicetos a partir de folhas (31 isolados) e raízes (22 isolados) de milho. Os autores testaram a atividade antimicrobiana dos isolados contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*, e constataram inibição frente a todos os microrganismos ensaiados, com exceção de *C. albicans*, que foi inibida apenas pelos isolados de *Streptomyces* sp.

BRADY e CLARDY (2000), na Costa Rica, isolaram fungos endofíticos e testaram sua atividade antifúngica. Um novo agente antimicótico, CR377, foi isolado do endófito *Fusarium* sp., mostrando potente atividade contra *Candida albicans* neste estudo.

LU et al. (2000) constataram atividade de três novos metabólitos produzidos pelo fungo *Colletotrichum* sp., isolado da planta medicinal *Artemisia annua* L. (Asteraceae), contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Pseudomonas* sp., atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, e inibição de crescimento de fungos patogênicos como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* e *Phytophthora capsici*.

A mesma planta foi alvo de estudo por LIU et al. (2001), da qual foram isoladas 39 linhagens endofíticas, e testada a atividade antifúngica contra fitopatógenos de trigo, como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium graminearum*, *Gerlachia nivalis* e *Phytophthora capsici*. Dos 39 endófitos investigados, 21 inibiram o crescimento de todos ou alguns dos microrganismos testados, mostrando a relevância das

pesquisas sobre o desenvolvimento de novos fungicidas para o combate a fitopatógenos.

RODRIGUES, HESSE e WERNER (2000) pesquisaram a presença de compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). Extratos dos fungos isolados *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* foram testados frente a quatorze microrganismos, incluindo actinomicetos, bactérias Gram negativas e Gram positivas, leveduras e fungos filamentosos. Todos os fungos inibiram o crescimento de actinomicetos. *Guignardia* sp. apresentou ainda atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Penicillium canadensis*. *P. guepinii* inibiu o crescimento de *S. cerevisiae*, enquanto linhagens de *Phomopsis* sp. mostraram um pronunciado efeito antifúngico contra *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*.

Em 2001, RODRIGUES-HEERKLOTZ et al. elucidaram a estrutura química e a síntese assimétrica de um novo metabólito, o ácido guignárdico, produzido pelo fungo *Guignardia* sp., isolado e estudado por RODRIGUES, HESSE e WERNER (2000).

SCRUGLI et al. (2000), na Itália, isolaram fungos endofíticos de raízes de várias espécies de orquídeas, dos gêneros *Barlia*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Neottia*, *Ophrys* e *Orchis*. Testaram a ação antibiótica dos isolados contra algumas linhagens de referência, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*, notando que no Meio BDA (Agar de Batata e Dextrose) os resultados foram melhor evidenciados do que no Meio Müller Hinton. Algumas espécies do gênero *Barlia* mostraram amplo espectro de ação antimicrobiana, enquanto em *Limodorum* as espécies testadas apresentaram atividade bastante específica, contra apenas um tipo de bactéria ou fungo.

SHIMIZU et al. (2000) estudaram actinomicetos isolados de *Rhododendron*, e concluíram que estes microrganismos podem ser agentes potenciais de controle biológico contra fungos patogênicos desta planta. Uma linhagem de *Streptomyces* sp., denominada de R-5, apresentou atividade contra bactérias Gram positivas,

leveduras e dois fungos patogênicos, *Phytophthora cinnamomi* e *Pestalotiopsis sydowiana*, mostrando ser promissora candidata para o controle de doenças que afetam a planta *Rhododendron*.

O ácido coletótrico, produzido pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., isolado da planta medicinal *Artemisia mongolica*, mostrou inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Sarcina lutea* com concentrações mínimas inibitórias (MICs) de 25, 50 e 50 µg/mL, respectivamente. Também apresentou atividade antifúngica contra o patógeno *Helminthosporium sativum*, a 50 µg/mL (MIC) (ZOU et al., 2000).

HUANG et al. (2001) testaram atividades antitumoral e antifúngica de fungos endofíticos isolados das plantas medicinais *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandis* coletadas na China. Demonstraram que 52,3% das amostras inibiram o crescimento de outros fungos, como *Neurospora* sp., *Trichoderma* sp. e *Fusarium* sp. Entre todos os endófitos isolados, o gênero *Paecilomyces* sp. apresentou a maior atividade antitumoral e antifúngica. Segundo os autores, os resultados confirmaram o indicativo de que os fungos endofíticos isolados de plantas medicinais podem ser uma fonte promissora de agentes bioativos antitumorais e antifúngicos.

LI e STROBEL (2001) purificaram duas ciclohexenonas, a jesterona e a hidroxil-jesterona, produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis jesteri*, isolado da planta *Fragraea bodenii* (Gentianaceae), das quais a primeira apresentou considerável atividade antifúngica contra o patógeno *Pythium ultimum*. Outra espécie de *Pestalotiopsis*, o *P. microspora*, isolado endofiticamente da planta *Terminalia morobensis* (Combretaceae), foi alvo de estudo de STROBEL et al. (2002), no qual isolaram e caracterizaram uma isopestacina (isobenzofuranona), que se mostrou ativa contra *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, entre outros. Adicionalmente, a isopestacina apresentou atividade antioxidante contra uma variedade de radicais livres testados.

SOUZA (2001) obteve 571 isolados de fungos e 74 de bactérias de plantas tóxicas da Amazônia, *Palicourea longiflora*, cujo gênero é responsável por 90% das mortes de gado na Região, e *Strychnos cogens*, cujo gênero é utilizado pelos

indígenas na confecção de "curares". Os fungos isolados de *P. longiflora* foram: *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger*, *Glomerella* sp., *Phomopsis* sp. e *Xylaria* sp., e bactérias endofíticas da espécie *Burkoderia gladioli*. Em *S. cogens* foram identificados os fungos: *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. Uma amostra de 79 isolados fúngicos teve seus metabólitos extracelulares bioensaiados contra microrganismos patogênicos e fitopatogênicos. Destes, 19 inibiram, pelo menos, um testador. Dentre os oito com melhores resultados de inibição, as moléculas bioativas eram menores que 12.000 daltons, fato verificado pela diálise dos metabólitos. Uma linhagem identificada como *Aspergillus niger* foi escolhida para melhoramento genético com luz UV. Dentre os irradiados foram selecionadas 50 linhagens para comparação com a selvagem nos bioensaios. Seis linhagens irradiadas foram comprovadas por avaliação estatística como melhores que o parental. Outros 25 isolados foram avaliados quimicamente e produziram esteróides, entre outras substâncias.

CASTILLO et al. (2002) isolaram e caracterizaram um novo antibiótico de largo espectro, a munumbicina, produzida por uma linhagem endofítica, denominada *Streptomyces* NRRL 30562, isolada da planta medicinal *Kennedia nigricans*, nativa do Norte da Austrália. O extrato do endófito, obtido com solvente orgânico, foi purificado e submetido a HPLC. Os quatro componentes principais resultantes foram denominados munumbicinas A, B, C e D. Nos ensaios contra alguns microrganismos patogênicos humanos, estes compostos demonstraram, em geral, atividade contra bactérias Gram positivas, como *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistente. A munumbicina B inibiu *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) com MIC de apenas 2,5 µg/mL, enquanto a munumbicina D apresentou atividade contra o parasita da malária *Plasmodium falciparum*. O extrato da linhagem de *Streptomyces* foi testado ainda contra vários patógenos de plantas, apresentando atividade contra *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erwinia carotovora*, *Cochliobolus carbonum* e *Penicillium* sp., mostrando o grande potencial destas novas substâncias para a medicina e agricultura.

HARPER et al. (2003) caracterizaram um composto denominado de pestacina (1, 3 – dihidro – isobenzofurano), produzido pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora*, com propriedade antifúngica e antioxidante.

STINSON et al. (2003) isolaram o fungo *Gliocladium* sp da planta *Eucryphia cordifolia*, na Patagônia. Este fungo produziu uma mistura de compostos orgânicos voláteis, letal para os fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum* e *Verticillium dahliae*. A descoberta de tais compostos mostra-se relevante para o uso na agricultura (micofumigação), bem como no tratamento de micoses em humanos (STROBEL, 2003). Da mesma forma, o endófito *Muscudor albus*, isolado da planta *Cinnamomum zeylanicum* (canela), foi descrito recentemente como produtor de antimicrobianos voláteis, que inibem o crescimento de bactérias e outros fungos (EZRA; STROBEL, 2003).

CORRADO e RODRIGUES (2004) observaram atividade antimicrobiana de 13 linhagens do fungo *Phomopsis* sp., isoladas endofiticamente de folhas da planta medicinal *Aspidosperma tomentosum* e de pecíolos da planta medicinal *Spondias mombin*. Do total, três extratos foram capazes de inibir todas as linhagens testadas, entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos, mostrando o grande potencial deste fungo como fonte de produtos bioativos.

2.2. Antagonismo entre microrganismos

A seleção de microrganismos antagonísticos pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. A grande maioria dos trabalhos publicados abrange uma seleção inicial ensaiada em laboratório, para posteriormente testar *in vivo*, no campo ou em casa de vegetação, sob condições controladas (MARIANO, 1993). Os métodos de seleção *in vitro* disponíveis podem ser qualitativos e quantitativos. Em geral, os qualitativos são realizados simultaneamente ao isolamento dos antagonistas, com a finalidade de abreviar o processo de seleção. A partir de amostras de solo supressivo ou de órgãos vegetais sadios, utilizam-se suspensões em solução tampão ou água esterilizada, diluídas em série ou concentradas por centrifugação.

A partir destas metodologias, os antagonistas são pré-selecionados para ensaios quantitativos. Para a seleção de biocontroladores, os métodos qualitativos são menos frequentemente utilizados que os quantitativos. Entre os quantitativos, estão os métodos do ágar em placa, do ágar em lâmina e do meio líquido, sendo preferencialmente usados os de ágar em placa. Dependendo dos objetivos do estudo, pode-se optar pelos métodos da cultura pareada, do papel celofane, da placa sobreposta, da camada dupla ou do líquido metabólico. O método da cultura pareada, também conhecido como pareamento, é o mais comumente utilizado em estudos de antagonismo *in vitro*. Consiste em diversas formas de plaqueamento de antagonista e fitopatógeno em placas de Petri contendo meios de cultura adequado ao crescimento de ambos os microrganismos. Em se tratando de dois fungos, deve-se observar a taxa de crescimento, a fim de que ocorra igualdade de condições competitivas. Outros fatores que podem influenciar são o tipo e a espessura do meio de cultura, bem como a temperatura de incubação.

De acordo com MARIANO (1993), existem várias formas de pareamento, algumas sendo descritas a seguir:

a) Discos de ágar

Consiste na deposição em um ou mais pontos da placa de Petri, de um cilindro de ágar contendo as estruturas do provável antagonista e do patógeno. Decorrido o período de incubação, observa-se e mensura-se o crescimento micelial do patógeno, bem como os diferentes tipos de interação (sobreposição de micélio, lise, vacuolação de hifas, formação de clamidosporos). O cilindro de ágar pode ser substituído por uma colônia bacteriana repicada com alça de platina. Alternativamente, o patógeno pode ser inoculado em meio fundido ou semeado em meio sólido por espalhamento de uma suspensão de esporos ou de células bacterianas, seguindo-se a deposição dos cilindros de ágar com os antagonistas (ICHIKAWA et al., 1971). Uma outra possibilidade é utilizar um vazador de rolha para obter um orifício no ágar, selando com meio ágar-água e preenchendo com suspensão de células bacterianas (KAWAMOTO e LORBEER, 1976).

b) Discos de papel de filtro

Consiste na deposição de um ou mais, em geral três discos de papel de filtro imersos na suspensão do antagonista, sobre uma camada de ágar contendo o patógeno. O disco também poderá ser umedecido depois de colocado em placa.

c) Riscas

Consiste em executar riscas com alça de platina, sobre a superfície de meio de cultura em placa de Petri, de bactérias ou leveduras a serem testadas contra um patógeno, que pode ser fungo ou bactéria. Estas riscas podem ser efetuadas em várias disposições, tais como: uma no centro da placa, duas em sentidos opostos, uma risca com várias perpendiculares, quatro riscas nas extremidades da placa, entre outras. Pode-se também usar um bastão de vidro para inocular a bactéria nos bordos do meio de cultura, ou um funil com diâmetro menor que a placa. Segue-se a deposição do patógeno, geralmente fungo, sob forma de cilindro de ágar contendo crescimento micelial, em diferentes locais da placa, dependendo da posição dos antagonistas.

d) Pulverização

Consiste na deposição prévia do antagonista, utilizando-se cilindros de ágar, suspensão com bactéria, discos de papel de filtro ou riscas, seguindo-se a pulverização com suspensão do patógeno.

Dentre os métodos de pareamento comentados, os mais utilizados na interação antagonista-fitopatógeno do tipo fungo-fungo são os de cilindro de ágar contendo estruturas, enquanto que para bactéria-fungo ou levedura-fungo são utilizados os de riscas com cilindros de ágar. Neste último caso, ênfase é dada à técnica da risca central e dois cilindros laterais pela simplicidade, eficiência e melhor visualização do fenômeno para leitura, permitindo duas medições por placa.

O método do papel celofane, também chamado de método para detecção de metabólitos não voláteis (GIBBS, 1967), consiste na transferência de um cilindro de crescimento fúngico ou crescimento bacteriano para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura apropriado, sobre papel celofane lavado e esterilizado. Após incubação e crescimento suficiente do microrganismo, efetua-se a retirada do papel celofane com o crescimento aderente e transfere-se para o

centro da placa um cilindro de ágar com crescimento fúngico. Como testemunha, observar o cultivo do patógeno após a retirada do papel celofane, sem crescimento do antagonista. Quando a testemunha atingir a extremidade da placa, mede-se o crescimento micelial e calcula-se a porcentagem de inibição. O método do papel celofane tem o objetivo específico de detectar a produção de metabólitos extracelulares não voláteis, devendo ser utilizado para a verificação do provável mecanismo de ação e não para a seleção de antagonistas.

O método da placa sobreposta, também chamado de método para detecção de metabólitos voláteis (DICK e HUTCHINSON, 1966), consiste no cultivo do antagonista em meio de cultura adequado em placa de Petri. Após um período de tempo, substitui-se a tampa da placa por um círculo de papel celofane, sobrepondo-se outra placa contendo o patógeno, e unindo as duas placas com fita adesiva. A avaliação deverá ser realizada comparando-se o crescimento dos patógenos em contato com os gases produzidos pelos antagonistas, com aquele da testemunha ao atingir a extremidade da placa.

O método da camada dupla é utilizado exclusivamente para a detecção de bacteriocinas (VIDAVER et al., 1972), consistindo em verter um meio de cultura adequado ao crescimento do isolado produtor da toxina, o qual é depositado em pontos equidistantes sobre o meio, sendo incubados por 48 horas. A bactéria é inativada pela ação de vapores de clorofórmio, por tempo que varia de cinco a vinte minutos, sobrepondo-se uma camada de ágar-água contendo a suspensão da bactéria fitopatogênica a ser controlada. Após esfriamento, incuba-se à temperatura ambiente por 24 a 48 horas, quando poderão ser observados e mensurados os halos de inibição.

O método do líquido metabólico, também conhecido como método do filtrado ou para detecção de antibióticos, consiste no cultivo do antagonista em meio de cultura líquido, com ou sem agitação, durante um determinado período de tempo, após o qual se faz a filtração do crescimento, com ou sem esterilização, ou ainda autoclavagem. Adicionam-se a um meio sólido, fundido e esfriado a 45°C, frações conhecidas do líquido metabólico. Após o esfriamento, coloca-se o patógeno com cilindros de ágar contendo micélio do fungo ou com discos de papel

de filtro imersos em cultura bacteriana. Avalia-se o crescimento do patógeno comparando-se ao da testemunha constituída de meio de cultura sem o líquido metabólico. Uma variação consiste na realização de orifícios em meio de cultura sólido, contendo o patógeno, selando-se a base da cavidade com uma fina camada de ágar-água. Coloca-se então o líquido metabólico do antagonista e, após incubação, observa-se o halo de inibição (KAWAMOTO e LORBEER, 1976).

O método do ágar em lâmina é considerado uma versão microscópica do ensaio em placa de Petri (ANDREWS, 1992), com a vantagem de que os resultados são obtidos com maior rapidez e podem ser visualizadas as interações em nível ultra-estrutural. Consiste na deposição de fina camada (0,1 mm) de meio de cultura sólido sobre lâminas limpas e flambadas. Estas, ainda quentes, são imersas em ágar-água a 2%. O ágar de uma das faces é retirado com papel de filtro esterilizado. Armazena-se em placas de Petri de 14 cm, sobre bastões de vidro em forma de “U”, para secagem por um dia, quando então se realiza o pareamento entre patógeno e antagonista. A incubação deve ser feita em placa de Petri com papel de filtro umedecido, envolvida em saco plástico, em condições de luminosidade adequadas (FOKKEMA, 1984). Outra versão seria a mistura do líquido metabólico no meio de cultura a ser depositado nas lâminas, colocando-se sobre estes cilindros de micélio do patógeno. A ação fungistática será notada pela inibição do crescimento micelial, enquanto a ação fungicida será evidenciada pela ausência de crescimento do patógeno, quando repicado para meio de cultura adequado.

O método do meio líquido consiste em colocar ambos os microrganismos, incubando-se, por tempo adequado, com ou sem agitação. É recomendado para a interação bactéria antagonista contra fungo patogênico, sendo a avaliação realizada por meio de filtração em tecido de nylon esterilizado, secagem em estufa a 60°C por 24 horas e pesagem do micélio seco. Pode-se ainda avaliar o parâmetro esporulação, bem como o tipo de ação antagonista. Uma variante deste método é o uso de lâminas escavadas ou placas de Petri divididas, nas quais se colocam suspensões, aquosas ou em meio de cultura líquido, contendo células ou conídios de ambos os microrganismos, incubando-se à temperatura adequada por

72 horas e avaliando-se a inibição da germinação com o auxílio do microscópio (CALLAN et al., 1990).

A bactéria *Enterobacter cloacae* isolada endofiticamente (ARAÚJO et al., 2002) de algumas plantas apresentou atividade antagonista contra *Fusarium moniliforme* (HINTON; BACON, 1995).

A fim de estudar o efeito de microambientes em bactérias associadas à cultura da batata, KRECHEL et al. (2002) analisaram a abundância e diversidade de bactérias isoladas da rizosfera, filosfera, endorriza e endosfera das áreas de plantio de batata, por meio de análise de RFLP de rDNA 16S. As populações dos microambientes ectofíticos (filosfera e rizosfera) se mostraram mais abundantes do que as dos microambientes endofíticos (endosfera e endorriza). As análises dos padrões moleculares obtidos revelaram uma alta heterogeneidade na composição das populações e sugeriram a existência de comunidades específicas para cada microambiente. O potencial antagonista de 440 isolados de bactérias foi avaliado in vitro frente aos patógenos *Verticillium dahliae* and *Rhizoctonia solani*. A proporção de antagonistas foi mais alta para os isolados da rizosfera (10%), seguidos da endorriza (9%), filosfera (6%) e endosfera (5%). Todos os 33 antagonistas foram caracterizados quanto às atividades glucanólítica, quitinolítica, pectinolítica, celulolítica e proteolítica. Foram ainda testados para o controle biológico de *Meloidogyne incognita*. Ao todo, nove isolados pertencentes a espécies de *Pseudomonas* e *Streptomyces* mostraram-se controladores tanto de *V. dahliae* e *R. solani*, como *M. incognita*, sendo portanto considerados como agentes promissores de controle biológico.

SESSITSCH, REITER e BERG (2004) testaram os mesmos isolados de bactérias contra outros patógenos, como os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora cactorum*, e as bactérias *Erwinia carotovora*, *Streptomyces scabies* e *Xanthomonas campestris*. Ao todo, sete endófitos apresentaram antagonismo contra estes patógenos, sendo considerados também como potenciais controladores biológicos. Em 2005, os mesmos autores testaram um maior número de bactérias quanto ao antagonismo, contra os mesmos patógenos, e

constataram como mais efetiva a linhagem *Serratia plymuthica* 3Re4-18, isolada de endorriza (BERG et al., 2005).

Em 2004, COOMBS e colaboradores avaliaram a atividade antagonista *in vitro* e *in vivo* de 38 linhagens de Actinobacteria isoladas endofiticamente de cereais frente a fungos patogênicos de trigo, observando que 64% delas apresentaram atividade antifúngica *in vitro* e 17 delas *in vivo* contra os patógenos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. Os autores destacam a importância destes microrganismos como agentes de controle biológico no campo, devido a sua capacidade de colonizar os tecidos internos da planta, contrariamente aos demais agentes testados.

PAUL (2004), estudando o controle biológico de microrganismos contra *Botrytis cinerea*, patógeno da cultura da uva, encontrou antagonismo pronunciado de um isolado de fungo do gênero *Pythium*, possivelmente se tratando de uma espécie nova, denominada *P. citrinum*, semelhante a *P. montanum*, recentemente descrita como intermediária entre os gêneros *Pythium* e *Phytophthora*.

CAO et al. (2005) isolaram 131 actinomicetos de raízes de banana e constataram inibição de crescimento por cerca de 20% dos isolados contra o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, destacando-se a linhagem S96 de *Streptomyces* sp., que obteve resultados promissores em ensaios de controle biológico *in vivo*.

TAECHOWISAN et al. (2005) observaram antagonismo da linhagem *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130, isolada de raízes de *Zingiber officinale* Rosc. (Zingiberaceae), contra *Colletotrichum musae* and *Fusarium oxysporum*, patógenos de banana e trigo, respectivamente. A antibiose foi demonstrada *in vitro* por zona de inibição de crescimento do fungo. O filtrado da cultura e o extrato bruto desta linhagem apresentaram inibição para os fungos fitopatogênicos testados. Os ingredientes ativos principais do filtrado da cultura de *S. aureofaciens* CMUAc130 foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel e identificados como (i) 5,7-dimetoxi-4-p-metoxilfenilcumarina e (ii) 5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina por NMR e dados de espectrometria de massa, respectivamente.

Estudos de bioensaio mostraram que os compostos (i) e (ii) apresentaram atividade antifúngica, com MICs de 120 e 150 µg/mL, respectivamente.

WICKLOW et al. (2005) isolaram um endófito de milho, o fungo *Acremonium zeae*, e observaram antagonismo contra *Fusarium verticillioides*. O extrato orgânico deste fungo endofítico revelou a presença de metabólitos recentemente caracterizados, denominados pirrocidinas A e B. A pirrocidina A exibiu forte atividade contra a maioria das bactérias Gram positivas e a levedura *Candida albicans*. Com relação aos ensaios em placas com meio BDA, dois entre treze isolados de *A. zeae* (NRRL 6415 e NRRL 34556) inibiram o crescimento dos fungos *A. flavus* e *F. verticillioides*.

2.3. Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.)

2.3.1. Aspectos botânicos, ecológicos e distribuição geográfica

A espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. pertence à classe Magnoliopsida, ordem Celastrales e família Celastraceae, a qual compreende 50 gêneros e cerca de 800 espécies (CRONQUIST, 1981). Popularmente pode ser denominada de espinheira-santa (PR, RS), cancorosa (PR), espinheira divina, erva cancorosa, erva santa, cancerosa (RS) (CARVALHO-OKANO, 1992), cancorosa-de-sete-espinhos, cancorosa, coromilho do campo, erva-cancerosa, espinha-divina, espinho-de-Deus, limãozinho, maiteno, marteno, pau-josé, salva-vidas, sombra-de-touro (BITTENCOURT, 2000).

O gênero *Maytenus* apresenta-se altamente diversificado, compreendendo 255 espécies, o maior número delas na América do Sul. O Brasil conta com 77 espécies, das quais 15 ocorrem apenas na Região Amazônica e 6 exclusivamente na região subtropical. *M. ilicifolia* predomina nos estados da Região Sul do Brasil e nos países vizinhos Paraguai, Bolívia e Leste da Argentina, mas distribui-se ainda, com menor intensidade, no Chile e Uruguai (CARVALHO-OKANO, 1992).

Observa-se *M. ilicifolia* predominantemente no sub-bosque de remanescentes da Floresta Ombrófila Mista, restringindo-se muitas vezes a ambientes ciliares, e nos agrupamentos arbóreos (capões) na região de predomínio das Estepes (CERVI et al., 1989).

M. ilicifolia é descrita como um subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, podendo medir até 5 metros de altura, com ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados. As folhas são congestas, coriáceas, glabras, com estípulas inconspícuas, limbo com 2,2 – 8,9 cm de comprimento e 1,1 – 3,0 cm de largura. As nervuras são proeminentes na face abaxial, de forma elíptica, com a margem inteira ou com espinhos, em número de 1 a vários, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos. As inflorescências ocorrem em fascículos multifloros e as sépalas apresentam-se semicirculares e ciliadas, as pétalas ovais e inteiras, os estames com filetes achatados na base, o estigma capitado, séssil ou com estilete distinto, o ovário saliente ou totalmente imerso no disco carnoso. As flores são monóclinas, apesar das evidências de que algumas sejam funcionalmente diclinas. O fruto é uma cápsula bivalvar, orbicular, com pericarpo maduro e de coloração vermelho-alaranjada. O florescimento ocorre entre os meses de setembro e outubro, podendo prolongar-se até dezembro, enquanto os frutos surgem entre outubro e fevereiro (CARVALHO-OKANO, 1992; RADOMSKI, 1998; BITTENCOURT, 2000).

A figura 1 mostra o aspecto do arbusto, das folhas, frutos e sementes de *M. ilicifolia*, a espinheira-santa.

2.3.2. Componentes químicos e propriedades terapêuticas

O gênero *Maytenus* tem sido bastante estudado na área de farmacologia. Alguns autores relacionam propriedades antimicrobianas e antitumorais de extratos de raízes e sementes em diversas espécies (LIMA et al., 1969; SANTANA; ASFORA; COTIAS, 1971; POWELL; SMITH Jr., 1979; KUTNEY et al.,

1981; FRANÇA; PEREIRA, 1997; CORSINO et al., 1998; SANNOMIYA et al., 1998; CORSINO et al., 2000; GONZALEZ et al., 2001; ORABI et al., 2001). Em *M. ilicifolia*, as propriedades terapêuticas foram atribuídas à produção de compostos terpênicos, como maitenina e pristimerina, tanto em raízes (LIMA et al., 1971; ITOKAWA et al., 1990; ITOKAWA et al., 1991), como em ramos e folhas (AHMED et al., 1981; ZHU; SHARAPIN; ZHANG, 1998; CORDEIRO; VILEGAS; LANÇAS, 1999; QUEIROGA et al., 2000; JORGE et al., 2004, *in press*), à presença de taninos (CARLINI, 1988; OLIVEIRA et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2000) e flavonóides (SILVA et al., 1991; LEITE et al., 2001).

FIGURA 1: A - Aspecto do arbusto de espinheira-santa; B – Aspecto do fruto tipo cápsula da espinheira-santa; C – Folhas e frutos maduros (deiscentes) de *M. ilicifolia*; D - Aspecto da semente de *M. ilicifolia*.



O extrato de folhas de *M. ilicifolia* foi analisado para comprovar a crença popular de que a espinheira-santa apresentasse efeito contraceptivo, ou fosse produtora de alguma substância controladora da fertilidade. MONTANARI, CARVALHO e DOLDER (1998) não encontraram qualquer efeito ou distúrbio na espermatogênese de ratos e MONTANARI e BEVILACQUA (2002) sugeriram cautela no uso indiscriminado da planta como anti-ulcerogênica, *in natura* ou em derivados fitoterápicos, por mulheres gestantes, devido a um estudo em fêmeas de ratos, que constatou uma diminuição significativa na implantação dos embriões após administração do extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas.

PULLEN et al. (2003) investigaram a presença de maitansinóides e maitansina, uma ansamicina de alta atividade citotóxica, em plantas da família Celastraceae coletadas em seu habitat natural na África do Sul (*Putterlickia verrucosa*, *P. pyracantha* e *P. retrospinosa*) e no Brasil (*M. ilicifolia*, *M. evonymoides*, *M. aquifolia*). Nas plantas brasileiras não foram detectados maitansinóides, contudo em algumas plantas sul-africanas estas substâncias estavam presentes. Foram realizadas análises moleculares do gene aminohidroxibenzoato sintetase, responsável pela biossíntese de aminohidroxibenzoato, precursor das ansamicinas, inclusive de maitansinóides, em cultura de células de *P. verrucosa*. Não foi verificada a presença deste gene nestas células, nem em DNA extraído de partes aéreas das plantas de *Putterlickia*. No entanto, observações indicam que este gene pode estar presente em microrganismos da rizosfera destas plantas. Possivelmente as raízes de *Putterlickia* estão associadas a microrganismos responsáveis pela biossíntese de maitansina ou maitansinóides.

FERREIRA et al. (2004) investigaram o efeito e o possível mecanismo de ação do extrato aquoso liofilizado de folhas de *M. ilicifolia* sobre a secreção de ácidos em mucosa gástrica de sapos. Os autores observaram uma redução de 16% da secreção ácida basal e sugeriram que seja devida a uma atividade antagonística do extrato nos receptores de H₂ de histamina.

2.3.3. Endófitos isolados de espinheira-santa

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

JANSEN (2002) isolou bactérias endofíticas de *Maytenus*, conhecida pelo seu potencial anti-leucêmico. Tais bactérias interagem com as plantas na produção de alguns metabólitos, como a maytensina, substância pertencente a uma classe de alcalóides do complexo dos ansamacrolídeos, que também apresentam propriedades antifúngicas. Amostras de extratos vegetais das plantas *M. aquifolia* e *M. ilicifolia* foram testadas contra o fungo indicador de substâncias bioativas *Penicillium avellanum*. Os extratos vegetais com atividade inibitória indicaram as hospedeiras para o isolamento das bactérias endofíticas alvo. Extratos de 112 bactérias endofíticas, isoladas de diferentes partes da planta, foram submetidos a partições com acetato de etila e testados contra o fungo *P. avellanum*. As bactérias inibidoras do crescimento de *P. avellanum* foram identificadas por métodos bioquímicos e moleculares. Os resultados indicaram que não havia presença de maytensina nas bactérias endofíticas, entretanto a bactéria 5, identificada como *Kluyvera cryocrescens*, apresentou duas substâncias que estavam inibindo o crescimento de *P. avellanum* que foram analisadas por cromatografia e espectrometria de massa para a elucidação estrutural.

PULLEN et al (2002) isolaram actinomicetos de *M. aquifolium*, *Putterlickia retrospinosa* e *P. verrucosa*. Foram identificadas duas espécies como *Streptomyces setonii* e *S. sampsonii*, enquanto outras duas foram consideradas espécies novas, denominadas Q21 e MaB-QuH-8. Esta última cepa produziu uma nova antraciclina clorada e cloropirrol, apresentando alta atividade contra uma série de bactérias multi-resistentes e micobactérias.

ZHAO et al. (2005) isolaram quatro compostos, incluindo dois novos macrolídeos, de *Streptomyces* sp. Is9131, endófito de *Maytenus hookeri*. Dados

espectrais indicaram que tais compostos eram dinactina dimérica (1), nonactina dimérica (2), ácido ciclo-homononáctico (3) e ácido ciclo-nonáctico. Nos bioensaios, a dinactina dimérica mostrou forte atividade antineoplástica e antibacteriana.

2.4. Marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

2.4.1. A metodologia RAPD

Em 1990, WILLIAMS et al. descreveram a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), sigla para DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso, que permite, de maneira rápida, avaliar o grau de similaridade entre genótipos, em níveis inter e intraespecífico. Simultaneamente e independentemente, outros dois pesquisadores, WELSH e McCLELLAND (1990), publicaram a metodologia com o nome de AP-PCR (*Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction*), considerado como mais adequado, uma vez que os *primers* são arbitrários, e portanto suas seqüências-alvo são desconhecidas, porém a amplificação ocorre em lugares específicos do genoma e não ao acaso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O princípio da técnica assemelha-se àquele de duplicação do DNA, para a qual são necessários: uma fita de DNA a ser amplificada na forma desnaturada ou de fita simples; a presença de *primers* ou oligonucleotídeos de 10 a 15 bases como iniciadores da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*), e uma enzima polimerase que catalisa a reação (*Taq* DNA polimerase). Esta reação consiste de ciclos repetidos de desnaturação, por aquecimento a 90-95°C, anelamento dos *primers*, pelo resfriamento para 36-42°C, e extensão do DNA, por meio de um novo aquecimento a 70-75°C, permitindo a ação da *Taq* DNA polimerase, resultando na amplificação de um fragmento alvo. Após 35 a 45

ciclos o DNA amplificado pode ser visualizado em gel de ágarose (SAIKI et al., 1985; CRUZ; MILACH, 1998).

Os polimorfismos dos fragmentos são reconhecidos pela presença ou ausência de bandas de DNA amplificado no gel, identificando-se os marcadores genéticos entre indivíduos, variedades e populações diferentes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Alterações na seqüência de bases que porventura ocorram nas regiões complementares aos oligonucleotídios eliminam um sítio de ligação do oligonucleotídio, enquanto inserções de seqüências entre estes sítios resultam em um segmento molde maior que o limite da PCR (4 a 10 kb, dependendo da DNA polimerase empregada), de forma que a amplificação não ocorre, sendo ambas as mutações reconhecidas pela ausência da banda no gel. As inserções que não ultrapassam o limite da PCR levam à amplificação, contudo produzem uma banda de peso molecular maior (BLANCO, 1999).

Os marcadores RAPD oferecem a possibilidade de amostrar regiões do DNA repetitivo, uma vez que os *primers* utilizados para detecção da variação são arbitrários, ao contrário das sondas RFLP que são pré-selecionadas para regiões de cópia única. O tamanho ideal do *primer* para a amplificação em RAPD é em torno de dez bases, devendo seu conteúdo GC ser em torno de 50 a 70%, e no mínimo de 40%. Além disso, os *primers* não devem conter seqüências palindrômicas a fim de evitar o autopareamento. As concentrações de *primer*, magnésio e DNA, também podem alterar tanto o número como a intensidade das bandas. (WILLIAMS et al., 1993; WANG et al., 1993).

Os RAPDs constituem uma classe de marcadores moleculares extremamente útil em estudos de tipagem molecular, taxonomia, genética de populações, mapeamento genético (GLIENKE, 1995), identificação de variedades patogênicas, obtenção de marcadores para diagnóstico via PCR (BLANCO, 1999; GLIENKE-BLANCO et al., 2002) e análise de recombinação via parameiose em fungos mitospóricos (DALZOTO et al., 2003). A técnica apresenta vantagens quanto ao custo acessível, pois os reagentes podem ser utilizados em pequenas quantidades e não envolve hibridização ou radioatividade. Permite a obtenção rápida de marcadores, pois não exige o isolamento de sondas, seqüenciamento

de nucleotídeos e nem o desenho de iniciadores específicos, além de caracterizar um bom nível de polimorfismo em várias espécies, com a obtenção de um número razoável de marcadores por gel (CRUZ; MILACH, 1998).

Além destas vantagens, o método requer pouco ou nenhum conhecimento prévio de genoma, bioquímica ou fisiologia do organismo em estudo (McCLELLAND; WELSH, 1990; CHRISTO, 2002). Oferece a possibilidade de automatização, devido à natureza binária (presença ou ausência de banda) do polimorfismo. Se por um lado não permite a distinção de heterozigotos, é uma característica mais adequada hoje para automatização do processo de aquisição de dados dentro da sistemática binária de ambientes computacionais.

2.4.2. RAPD em microrganismos endofíticos

A técnica de RAPD tem sido útil em estudos de variabilidade genética em vários organismos, inclusive em fungos endofíticos (MANULIS et al., 1993; HOLMES; ECKERT; PITT, 1994; LIEW; IRWIN, 1994; MEIJER; MEGNEGNEAU; LINDERS, 1994; NICHOLSON; REZANOON, 1994; RIBEIRO, 1995; LONGO, 1996; GUIMARÃES, 1998).

Marcadores RAPD têm sido utilizados para diferenciar patógenos de crucíferas, por exemplo, o fungo *Leptosphaeria maculans* (GOODWIN; ANNIS, 1991), e de *Brassica napus* (SCHÄFER; WÖSTEMEYER, 1992).

MANULIS et al. (1993) isolaram linhagens de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, de cravo, constatando diferenças entre as patogênicas e não patogênicas por meio de marcadores RAPD.

Existem diversos trabalhos na literatura comparando isolados de locais diferentes, utilizando RAPD, como MEIJER, MEGNEGNEAU e LINDERS (1994), com *Phomopsis subordinaria*, NICHOLSON e REZNOON (1994), em *Pseudocercospora herpotrichoides*, e HOLMES, ECKERT e PITT (1994), com espécies patogênicas de *Penicillium* isoladas de citros.

ARAÚJO et al. (2001) isolaram fungos e bactérias de tecidos foliares de *Citrus* e testaram a variabilidade genética por RAPD de 36 isolados de duas

espécies de bactérias encontradas, *Bacillus pumilus* e *Pantoea agglomerans*, observando uma maior diversidade em *B. pumilus* do que em *P. agglomerans*.

Bactérias endofíticas isoladas de raízes de cana-de-açúcar foram investigadas por SUMAM et al. (2001). Neste estudo, 22 linhagens bacterianas foram comparadas morfológicamente, bioquimicamente e geneticamente por RAPD, utilizando doze *primers* para comparar as linhagens isoladas e linhagens padrão de bactérias diazotróficas. A diversidade estimada por RAPD foi mais evidente que a obtida pela análise dos caracteres morfológicos e bioquímicos.

Em *Citrus* sp., GLIENKE-BLANCO et al. (2002) encontraram uma alta variabilidade genética em isolados de *Guignardia citricarpa*, verificando a existência de pelo menos duas espécies geneticamente diferenciadas, uma sendo endofítica, *G. mangiferae*, e outra, *G. citricarpa*, causadora da mancha preta de citros (MPC) (BLANCO, 1999; BAAYEN et al., 2002).

SEYMOUR et al. (2004) estudaram 49 isolados dos fungos endofíticos *Cylindrocarpon destructans* and *Heliscus lugdunensis*, relacionando a produção de metabólitos com a diversidade genotípica por meio de RAPD e sequenciamento de ITS de rDNA. Os autores verificaram uma correlação positiva entre a classificação genotípica e o padrão de produção de metabólitos. Foi realizada uma nova seleção de isolados baseada na variabilidade genotípica, obtendo-se um maior número de produtores de metabólitos, quando comparada aos selecionados indiscriminadamente.

2.4.3. RAPD em *Colletotrichum*

GALVÃO (1998) isolou fungos endofíticos de folhas aparentemente saudáveis, de *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides*, e *Scleria pterota*, identificados como *Glomerella cingulata* e seu anamorfo *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Pestalotia* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Xylaria* sp. e *Humicola* sp. O endófito mais freqüente isolado em *P. phaseoloides* e *S. pterota* foi *G. cingulata*, enquanto que em *T. grandiflorum*, o endófito mais freqüente foi *Guignardia* sp. O fungo *Pestalotia* sp. foi encontrado em *T. grandiflorum* e em *S.*

pterota. *Humicola* sp. foi encontrado em *T. grandiflorum* e *P. phaseoloides*. *Fusarium* sp. apareceu apenas nos isolados de *T. grandiflorum*, *Xylaria* sp. somente em *P. phaseoloides* e *Curvularia* sp. somente em *S. pterota*. Isolados de *G. cingulata* foram detectados nos três hospedeiros e oito *primers* foram utilizados para a determinação dos perfis de RAPD. A distância genética entre os isolados de *T. grandiflorum*, *P. phaseoloides* e *S. pterota* foi 54,28%, 70,16% e 67,81% e a proporção de loci polimórfico foi 0,91; 0,94 e 0,93 respectivamente. Os 30 fungos foram agrupados em seis grupos, e os isolados de *T. grandiflorum* apresentou maior similaridade genética.

KELEMU et al. (1999) avaliaram o grau de diversidade genética de 127 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em *Stylosanthes guianensis*, por meio de marcadores moleculares RAPD e RFLP. Foram utilizados nove *primers*, revelando um total de 80 bandas. Dos 127 isolados, 63 foram agrupados em 13 linhagens distintas, geralmente relacionadas com a origem geográfica. Quando os isolados de regiões distintas pertenciam ao mesmo grupo, a maioria deles provinha de um mesmo genótipo de planta hospedeira. Uma população de Carimagua, Colômbia, um antigo sítio de cruzamento e seleção de *Stylosanthes*, apresentou alta diversidade. Um grupo de 12 genótipos diferenciais de *S. guianensis* foi utilizado para caracterizar a variabilidade patogênica de 104 isolados, e seus padrões de virulência foram agrupados em 57 patótipos. No entanto, quando testados com 4 diferenciais australianos, agruparam em apenas 11 patótipos. A análise de *Southern Blot* dos 127 isolados revelou 23 fragmentos de hibridização, resultando 41 padrões de *fingerprint* entre os mesmos. Análises estatísticas das relações entre as variáveis de RFLP e RAPD mostraram que as duas medidas de variação genotípica estão concordantes.

LARDNER et al. (1999) investigaram as relações entre diversos grupos morfológicos de *Colletotrichum acutatum* por meio de análise de RAPD e compatibilidade vegetativa. Os isolados foram coletados de *Lupinus* spp. da Nova Zelândia, Canadá, França e Inglaterra, e de *Pinus radiata* na Nova Zelândia e Austrália. As diferenças genéticas entre os grupos foram confirmadas com os

dados morfológicos. Dois grupos geneticamente distintos de *C. acutatum* foram observados em *Lupinus* spp., um compreendendo os isolados da Nova Zelândia e da Inglaterra, e os outros isolados do Canadá e França. Os isolados de *C. acutatum* f. sp. *pineum* da Nova Zelândia e Austrália formaram dois grupos geneticamente distintos.

MARTINEZ-CULEBRAS et al. (2002) realizaram um estudo por meio de marcadores RAPD em isolados de *Colletotrichum* patógenos do morango, de vários países. A variabilidade foi maior em *C. acutatum*, em que foram observados 15 padrões de RAPD diferentes, formando dois grupos principais após análise por grupamentos UPGMA. Duas espécies morfológicamente indistinguíveis, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*, puderam ser diferenciadas por RAPD, porém apresentaram menor variabilidade genética. Uma banda de RAPD associada a *C. fragariae* foi clonada, seqüenciada e usada para desenhar *primers* específicos para esta espécie. Um produto de PCR de 580 pb foi obtido apenas quando o DNA de *C. fragariae* foi utilizado, proporcionando um método rápido e eficaz de identificação de linhagens de *C. fragariae*.

SAHA et al. (2002) estudaram marcadores moleculares RAPD em 25 isolados de *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) patógenos de folhas de *Hevea brasiliensis* (borracha), responsáveis por três tipos de lesões diferentes. Os perfis de RAPD dos isolados que causavam um tipo de sintoma eram facilmente distinguíveis dos que originavam os outros dois tipos. A análise de restrição de DNA ribossomal 5,8S amplificado por PCR, incluindo ambas as regiões ITS flangeadoras, também revelou dois padrões de RFLP distintos, os mesmos do RAPD, sugerindo existirem duas espécies de *Colletotrichum* associadas a *Hevea*: *C. acutatum* causando um tipo de sintoma, e *C. gloeosporioides* os outros dois tipos. Este foi o primeiro relato de *C. acutatum* de *Hevea* na Índia.

Como observado por SILVA-MANN et al. (2002), a antracnose e a ramulose são doenças do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) causadas, respectivamente, por *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, sendo a ramulose a mais importante sob o ponto de vista de prejuízos causados. Por se tratarem de fungos transmitidos por sementes, de difícil diferenciação por métodos

convencionais, o desenvolvimento de metodologia usando técnicas moleculares é uma opção que se dispõe na busca de maior precisão e rapidez. Os autores procuraram associar informações do teste de patogenicidade com marcadores bioquímicos e moleculares de DNA/RAPD, visando à identificação e diferenciação do complexo *Colletotrichum*. Foram usados dez isolados, sendo três classificados como causadores de antracnose e sete de ramulose, pelo teste de patogenicidade. Os marcadores bioquímicos não se mostraram eficientes para a distinção dos isolados causadores da ramulose e da antracnose. Entretanto, na análise de RAPD, o valor de similaridade encontrado para os dois grupos foi de 51,7%, confirmando a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos.

DAUCH et al. (2003) desenvolveram marcadores moleculares RAPD para reconhecer seletivamente e detectar a presença da linhagem 183088 do fungo *Colletotrichum coccodes* no controle biológico da espécie-alvo *Abutilon theophrasti* e em amostras de solo. Os marcadores foram convertidos em SCARs (*Sequence-Characterized Amplified Regions*) e um conjunto de *primers* específicos (N5F/N5R; N5Fi/N5Ri) foi desenhado para uso em ensaios de PCR. Cada conjunto de *primers* amplificou um único produto com o DNA da linhagem 183088, um de 617 pb (N5F/N5R) e outro de 380 pb (N5Fi/N5Ri). A especificidade dos *primers* foi confirmada pela ausência de produtos amplificados com o DNA de outros isolados de *C. coccodes*, outras espécies do gênero *Colletotrichum* e outros onze microrganismos. Os ensaios de PCR realizados neste trabalho permitiram a detecção da linhagem 183088 de *C. coccodes* entre amostragens de microrganismos de solo e mostraram-se úteis para o monitoramento no controle biológico.

DERSO e WALLER (2003) analisaram a variação em isolados de *Colletotrichum* provenientes de frutos de café de vários locais da Etiópia, sob o aspecto morfológico, tamanho de conídios, patológicos e marcadores RAPD. Os estudos patológicos de agressividade sugeriram duas espécies diferentes, *C. gloeosporioides* e *C. kahawae*, mas as análises moleculares mostraram pouca variabilidade entre os isolados. Os autores observaram que *C. kahawae* causa antracnose em frutos de café, ocasionando grandes perdas na produtividade,

enquanto *C. gloeosporioides* deve ocorrer como saprofítico, colonizador secundário de tecidos danificados e provavelmente como endófito em tecidos saudáveis.

MEAUX et al. (2003) avaliaram quinze populações de feijão (*Phaseolus vulgaris*), localizadas em três províncias da Argentina, quanto ao polimorfismo para uma família complexa de genes candidatos de resistência (RGC) no genoma de *Colletotrichum lindemuthianum*, bem como os fenótipos de resistência para estas linhagens. Os resultados indicaram um alto polimorfismo para os RGC. A estrutura populacional obtida para marcadores relacionados à resistência foi comparada com a observada para marcadores RAPD, sendo constatadas diferenças dentro das províncias para os dois marcadores, enquanto que entre as províncias a diferenciação ocorreu apenas para RAPD e RGC, e não para fenótipos de resistência. Esta discrepância indica que forças seletivas distintas estão atuando ao nível molecular e fenotípico, o que revela a importância deste tipo de análise para demonstrar um impacto de seleção.

LU et al. (2004) estudaram a diversidade e especificidade de hospedeiro de uma coleção de linhagens endofíticas de *Colletotrichum* provenientes de 12 espécies de plantas da Reserva Florestal de Iwokrama, na Guiana. Por meio de RAPD e sequenciamento de ITS de rDNA, bem como caracterização morfológica das colônias, puderam concluir que a maioria das linhagens pertencia a uma das duas espécies, *C. gloeosporioides* e *C. honinense*.

TALHINHAS et al. (2005) propuseram-se a determinar a diversidade e o padrão de distribuição de populações de *Colletotrichum* spp. em culturas de azeitonas e sua relação com os patógenos de antracnose em outros hospedeiros, bem como avaliar a variabilidade patogênica e a preferência de hospedeiros, e ainda desenvolver ferramentas para diagnósticos. Um total de 128 isolados de *Colletotrichum* spp., representando todas as áreas de cultivo de azeitonas de Portugal e alguns isolados de outros países, foram caracterizados por ensaios moleculares e fenotípicos e comparados com isolados de referência. Os dados de RAPD, ITS, seqüências de beta-tubulina 2, características das colônias e sensibilidade ao benomyl, mostraram que *C. acutatum* foi dominante (mais de

97%) e *C. gloeosporioides* de ocorrência limitada (menos de 3%). Entre as populações de *C. acutatum*, foram identificados cinco grupos moleculares, A2 a A6. O grupo A2 foi altamente prevalente (89%), coincidindo com a alta incidência de antracnose. O grupo A4 foi dominante em uma região em particular, enquanto os outros grupos de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foram de ocorrência esporádica nas áreas marginais de cultivo. Foram desenvolvidas ferramentas para diagnóstico a partir de seqüências de beta-tubulina 2, a fim de detectar e diferenciar os grupos do patógeno *C. acutatum* com rapidez e confiabilidade.

VALÉRIO et al. (2005) avaliaram a diversidade genética por marcadores RAPD e RFLP-PCR entre 37 isolados de *Colletotrichum graminicola*, patógeno causador da antracnose do sorgo, provenientes de quatro regiões do Brasil geograficamente distintas. Ainda foram analisadas as características de virulência em um grupo de 10 genótipos diferenciais de sorgo. Foram identificadas 22 raças, sendo mais freqüente a 13B, porém presente em apenas duas regiões. As análises de RAPD revelaram 143 bandas polimórficas que agruparam os isolados de acordo com suas origens geográficas, mas não por seus fenótipos de virulência. O RFLP sobre os domínios ITS e genes de rDNA 5,8 de *C. graminicola* não mostrou diferenças entre os isolados, indicando uma conservação destes sítios de restrição. Foi observado um polimorfismo molecular entre isolados da mesma raça. Não foi verificada associação entre fenótipos de virulência e perfis moleculares.

MUNAUT et al. (2002) analisaram 119 isolados mexicanos, dois australianos (A e B) e dois africanos (A e B) de *C. gloeosporioides*, provenientes da planta nativa *Stylosanthes*, por meio de RAPD e ITS. Estudos anteriores destes e de outros autores levaram à proposição de uma diferenciação taxonômica infraespecífica, como *C. gloeosporioides* f. *stylosanthis* f. sp. *stylosanthis* e f. sp. *guianensis*.

SHARMA et al. (2005) analisaram 37 isolados de *Colletotrichum capsici*, patógenos de *Capsicum annum* L. (pimenta da Guiné). Os isolados foram divididos com base nas características morfológicas e de cultura em cinco grupos, Cc-I, Cc-II, Cc-III, Cc-IV e Cc-V. Não foram observadas diferenças significativas no

formato e tamanho dos conídios. As relações genéticas entre os cinco grupos foram investigadas por meio de RAPD, confirmando os cinco agrupamentos dos isolados de *C. capsici*. No entanto, quatro isolados (Cc-5, Cc-33, Cc-29 e Cc-37) exibiram perfis de RAPD idênticos. Não foi observada correlação entre os grupos revelados por RAPD e a patogenicidade dos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram utilizados microrganismos endofíticos isolados de 13 plantas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.), localizadas no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (CNPQ) da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), no município de Colombo, PR. Para a coleta do material foi realizada uma seleção aleatória das plantas adultas, sendo escolhidas as folhas de aspecto jovem e sadio. As plantas foram devidamente marcadas e posteriormente realizadas coletas de frutos. A localização das plantas na área de coleta pode ser visualizada na Figura 2.

FIGURA 2: Croqui da área experimental de espinheira-santa no Centro Nacional de Pesquisas de Floresta (CNPQ), EMBRAPA, Colombo, PR

Espaçamento: 2,0 x 1,0 m

----- EUCALIPTOS -----

L21	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641											
L20	611	610	609	608	607	606	605	604	603	602	601	600	599	598	597	596	595	594	593	592	591	590	589	588	587	586	585	584	583	582											
L19	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581											
L18	551	550	549	548	547	546	545	544	543	542	541	540	539	538	537	536	535	534	533	532	531	530	529	528	527	526	525	524	523	522											
L17	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521											
L16	491	490	489	488	487	486	485	484	483	482	481	480	479	478	477	476	475	474	473	472	471	470	469	468	467	466	465	464	463	462											
L15	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461											
L14	431	430	429	428	427	426	425	424	423	422	421	420	419	418	417	416	415	414	413	412	411	410	409	408	407	406	405	404	403	402											
L13	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401											
L12	371	370	369	368	367	366	365	364	363	362	361	360	359	358	357	356	355	354	353	352	351	350	349	348	347	346	345	344	343	342											
L11	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341											
L10	311	310	309	308	307	306	305	304	303	302	301	300	299	298	297	296	295	294	293	292	291	290	289	288	287	286	285	284	283	282											
L9	252	253	254	255	256	257	258	258	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281											
L8	251	250	249	248	247	246	245	244	243	242	241	240	239	238	237	236	235	234	233	232	231	230	229	228	227	226	225	224	223	222											
L7	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221											
L6	191	190	189	188	187	186	185	184	183	182	181	180	179	178	177	176	175	174	173	172	171	170	169	168	167	166	165	164	163	162	161	160	159	158	157	156	155	154	153	152	151
L5												121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
L4												120	119	118	117	116	115	114	113	112	111	110	109	108	107	106	105	104	103	102	101	100	99	98	97	96	95	94	93	92	91
L3												61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
L2												60	59	58	57	56	55	54	53	52	51	50	49	48	47	46	45	44	43	42	41	40	39	38	37	36	35	34	33	32	31
L1												1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

Legenda: Em amarelo, estão destacadas as plantas utilizadas para as coletas de folhas e frutos de espinheira-santa.

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Ágar de Batata e Dextrose (BDA)

Batatas	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	p/ 1000 mL
pH	6,8

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada por 20 a 30 minutos em forno de microondas. Após filtração através de gaze, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 N antes de adicionar o ágar.

3.2.2. Meio Líquido de Batata e Dextrose (BDL)

Batatas	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Água destilada	p/ 1000 mL
pH	6,8

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada por 20 a 30 minutos em forno de microondas. Após filtração através de gaze, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 N.

3.2.3. Ágar Sabouraud Dextrose (SDA)

Dextrose	20,0 g
Peptona	10,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	p/ 1000 mL
pH	6,8

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

3.2.4. Caldo de Extrato de Malte (MEB)

Extrato de malte	20,0 g
Peptona	1,0 g
Glucose	20,0 g
Água destilada	p/ 1000 mL
pH	6,8

Todos os ingredientes foram misturados em água destilada, sob agitação. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 N.

3.2.5. Meio Seletivo para Isolamento de Actinomicetos (AC)

(KÜSTER; WILLIAMS, 1964)

Amido (ou glicerol)	10,0 g
Caseína	0,3 g
KNO ₃	2,0 g
NaCl	2,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
CaCO ₃	0,02 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Ágar	18,0 g
Água destilada	p/ 1000 mL
pH	7,0–7,2

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

3.2.6. Ágar Nutriente (NA)

Peptona de gelatina	5,0 g
Extrato de carne bovina	3,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	p/ 1000 mL

3.2.7. Ágar Müeller 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 mL

3.2.8. Caldo Nutriente (NB)

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

3.2.9. 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
Glucose	10,0 g
Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
H ₂ O	p/ 1000 mL
Ágar	15,0 g
pH	5,8

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

3.2.10. Meio Completo Líquido (MCL)

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
Glucose	10,0 g

Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL
H ₂ O	p/ 1000 mL
pH	5,8

Todos os ingredientes foram misturados em água destilada, sob agitação. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH foi ajustado com NaOH 1 N.

3.2.11. Ágar Mueller Hinton 0,85%

Infusão de carne bovina	30,0 g
Peptona de caseína ácida	17,5 g
Amido	1,5 g
Ágar	8,5 g
Água destilada	p/ 1000 mL

OBS.: Todos os meios de cultura foram autoclavados antes do uso, a 120°C, 1 atm, por 20 minutos.

3.3. Soluções e tampões

3.3.1. Clorofil

Clorofórmio	240 mL
Álcool isoamílico	10 mL

3.3.2. Clorofane

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

3.3.3. Benomyl

Benlate	20,0 mg
Água destilada autoclavada	10 mL

Ao Benlate foram adicionadas aproximadamente 2 a 3 gotas de acetona para dissolver e em seguida a água destilada autoclavada. A solução foi fervida em banho-maria por 10 a 15 minutos, mantida no escuro e estocada sob refrigeração a 4°C.

3.3.4. Lactofenol Azul de Algodão

a) Lactofenol	
Fenol	20 g
Ácido láctico	40 mL
Glicerina	40 mL
Água destilada	20 mL

b) Azul Algodão	
Azul algodão	0,5 g
Água destilada	50 mL

Para o preparo da solução final, foram misturados 100 mL de lactofenol, 5 mL de azul algodão e 20 mL de ácido acético glacial.

3.3.5. Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TBE 1X	100 mL

3.3.6. Gel de Agarose (1,5%)

Agarose	1,5 g
Tampão TBE 1X	100 mL

3.3.7. RNase

A enzima foi preparada na concentração de 10 mg/mL, em 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 15 mM de NaCl. Foi aquecida a 100°C por 15 minutos e estocada a -20°C.

3.3.8. Solução de Brometo de Etídio

O brometo de etídio foi dissolvido a 1% (p/v) em água destilada, mantido sob agitação por algumas horas e estocado a temperatura ambiente, protegido de luz. No momento do uso, foram adicionados 3 μ L desta solução a 100 mL de tampão TBE 1X.

3.3.9. Tampão da Amostra (6X)

Azul de bromofenol 3%	1 mL
Glicerol	1,035 mL
H ₂ O	5 mL

3.3.10. Tampão de Corrida TBE 10X pH 8,0

Trizma base	54,0 g
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	27,5 g
EDTA	4,65 g
H ₂ O	500 mL

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

3.3.11. Solução de Glicerol 20%

Glicerol	20 mL
H ₂ O milli-Q q.s.p.	100 mL

A solução foi autoclavada e estocada sob refrigeração a 4^oC.

3.3.12. Tampão de Extração de DNA (TE)

(preparado no momento do uso)

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

3.3.13. Tampão Tris-EDTA (TE)

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

A solução foi autoclavada e estocada sob refrigeração a 4^oC.

3.3.14. Solução Estoque de Tetraciclina

Tetraciclina	1,0 g
Etanol absoluto	20 mL

A solução foi preparada sob agitação e estocada em frasco escuro a -20^oC.

3.3.15. Solução Estoque de Nistatina

(preparada no momento do uso)

Nistatina	100 mg
Metanol	10 mL

3.3.16. Solução Estoque de Ciclohexamida

Ciclohexamida	610 mg
Acetona	0,5 mL
Água destilada	30 mL

A solução foi preparada, esterilizada por filtração e estocada a 4^oC.

3.3.17. Solução Estoque de Ácido Nalidíxico

Ácido nalidíxico	200 mg
Água destilada	10 mL

A solução foi preparada, esterilizada por filtração e estocada a 4^oC.

3.3.18. Solução de Vitaminas

Ácido nicotínico	100,0 mg
Ácido p-aminobenzóico	0,2 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Água destilada	p/ 100 mL

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos, e mantida em um frasco escuro sob refrigeração a 4°C.

3.3.19. Solução de *Tween 80* a 0,1% (v/v)

<i>Tween 80</i>	0,1 mL
Água destilada	p/ 100 mL

A solução foi autoclavada e estocada sob refrigeração a 4°C.

3.3.20. Solução Salina a 0,85%

NaCl	850 mg
Água destilada	p/ 100 mL

A solução foi autoclavada e estocada sob refrigeração a 4°C.

3.4. Métodos

3.4.1. Isolamento dos microrganismos endofíticos

A metodologia utilizada para o isolamento dos microrganismos endofíticos está descrita em PETRINI (1991) com algumas modificações. Foram realizadas sete coletas, de outubro de 2002 a junho de 2004. Os diferentes órgãos da planta, temperaturas de incubação e meios de cultura utilizados e o número de fragmentos plaqueados, estão listados na Tabela 1.

TABELA 1: Épocas do ano, órgãos da planta, condições de incubação e n°. de fragmentos plaqueados nas sete coletas de endófitos de espinheira-santa

Coleta	Época do ano	Órgão da planta	Meio de cultura	Temperatura de incubação	N°. de fragmentos plaqueados
1	Outubro/02	Folha	BDA + Te BDA + Be	18°C e 28°C	128
2	Fevereiro/03	Semente	BDA + Te NA + Be	18°C e 28°C	416
3	Março/03	Folha	BDA + Te NA + Be AC+Ni+Ci+Nx	18°C e 28°C	720
4	Agosto/03	Folha	BDA + Te NA + Be AC+Ni+Ci+Nx	18°C e 28°C	552
5	Janeiro/04	Semente	BDA + Te NA + Be	18°C e 28°C	384
6	Junho/04	Folha	AC+Ni+Ci+Nx pH 4,5 e 6,0	18°C	132
7	Junho/04	Pecíolo	AC+Ni+Ci+Nx pH 4,5 e 6,0	18°C	168
Total de fragmentos plaqueados					2500

Foram coletadas folhas com pecíolos, de vários indivíduos devidamente identificados, acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e levadas ao laboratório, sendo mantidas sob refrigeração por até 24 horas. Para desinfestação da superfície do material, a fim de se eliminarem os microrganismos epifíticos, as folhas foram lavadas em água corrente abundante, enquanto foram levemente esfregadas com auxílio de uma esponja. Os pecíolos foram parafinados para evitar a entrada da solução esterilizante nos tecidos internos das folhas, desta forma preservando os endofíticos a serem isolados. Em seguida, as folhas foram

imersas em água destilada esterilizada por 1 minuto, etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3%, por 4 minutos, novamente lavadas em etanol 70% por 30 segundos, e por último em água destilada esterilizada por 6 minutos. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, utilizando tempos diferentes de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl), de 7 e 10 minutos. As folhas foram cortadas em quatro fragmentos, utilizando um bisturi esterilizado, sob assepsia. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri com diferentes meios de cultura.

Para o isolamento de microrganismos de pecíolos, a desinfestação consistiu do mesmo procedimento, porém o tempo de imersão no hipoclorito de sódio foi apenas o de 7 minutos. Os pecíolos foram cortados com auxílio de um bisturi esterilizado, e oito fragmentos foram colocados em cada placa de Petri com meio AC (item 3.2.5).

Para o isolamento de endófitos de sementes, a desinfestação consistiu dos mesmos passos, porém o tempo de imersão no hipoclorito de sódio foi apenas o de 4 minutos. As sementes foram cortadas ao meio utilizando um bisturi esterilizado, sendo transferidos oito pedaços para cada placa de Petri contendo os diferentes meios de cultura.

Foi utilizado um total de 2500 fragmentos para o isolamento de endófitos de espinheira-santa, sendo 1532 de folhas, 800 de sementes e 168 de pecíolos (Tabela 1). Diferentes meios de cultura foram empregados, visando preferencialmente o isolamento de fungos (BDA + Tetraciclina 100 µg/mL), bactérias (NA + Benomyl 6 µg/mL) ou actinomicetos (AC + Nistatina 50 µg/mL + Ciclohexamida 50 µg/mL + Ácido Nalidíxico 10 µg/mL). Variou-se também a temperatura de incubação e/ou o pH do meio, com o propósito de isolar uma diversidade maior de microrganismos endofíticos. Nos isolamentos realizados em junho de 2004, visou-se particularmente o isolamento de actinomicetos.

Como controle, após o processo de desinfestação, foram inoculados 0,1 mL da última água destilada esterilizada, em três placas de Petri, para cada tipo de meio de cultura ensaiado. As placas permaneceram incubadas nas mesmas condições do isolamento.

Os isolados foram estocados sob refrigeração a 4⁰C, em frascos com meio inclinado Ágar Nutriente (item 3.2.6), se tratando de bactérias, ou Ágar de Batata e Dextrose (item 3.2.1), para fungos, e os actinomicetos no Meio Seletivo para Actinomicetos (item 3.2.5).

3.4.2. Identificação dos microrganismos endofíticos

Os fungos endofíticos foram identificados por meio de observação macroscópica da colônia e microscópica das estruturas de reprodução após crescimento em meio BDA (item 3.2.1), em diferentes condições de temperatura (18⁰C e 28⁰C) e luminosidade (12 e 24 horas de luz). Adicionalmente, foram realizados microcultivos em meio BDA, a 28⁰C, de acordo com a metodologia de KERN e BLEVINS (1999). No interior de uma placa de Petri esterilizada, contendo uma lâmina para microscopia, foi colocado um cubo de ágar BDA de aproximadamente 1,5 cm de aresta, inoculado o micélio em cada um dos quatro lados superiores do cubo e coberto com uma lamínula esterilizada. A umidade foi mantida com o auxílio de um pedaço de algodão embebido em água destilada esterilizada, e a placa foi vedada com filme de PVC. Em 7 e 14 dias de cultivo foram retiradas as lamínulas com auxílio de uma pinça e montadas as lâminas de microscopia com o corante lactofenol azul de algodão.

As bactérias endofíticas foram purificadas por semeadura em estrias em meio NA (item 3.2.6) e submetidas à coloração de Gram (KONEMAN et al., 2001). As que apresentaram atividade antagonista foram identificadas ao nível de espécie por meio de *kits* para diagnóstico microbiológico (*enterokits* B e C, para enterobactérias, e *Staphy test*, para estafilococos, da Probac).

3.4.3. Antagonismo dos isolados endofíticos contra os microrganismos patogênicos

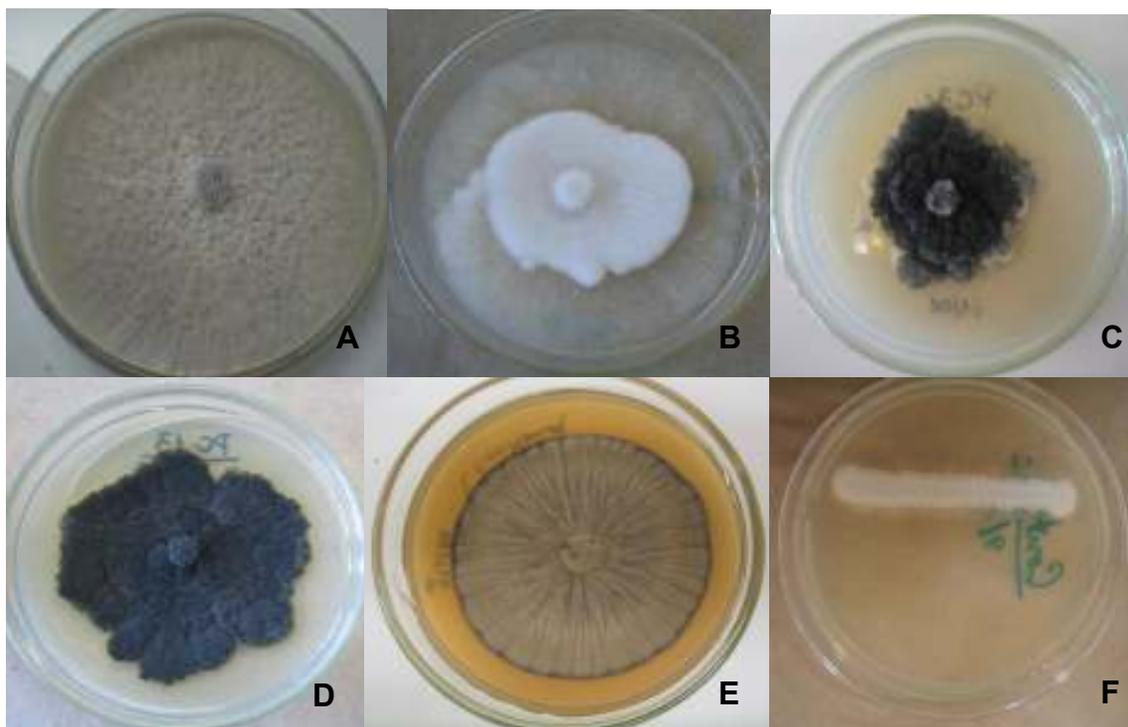
3.4.3.1. Atividade antifúngica em meio sólido

O antagonismo dos endófitos de espinheira-santa foi ensaiado pelo método da cultura pareada, ou simplesmente pareamento, que consistiu no confronto direto do antagonista (endófito) e do fungo patogênico em placas de Petri contendo meio de cultura sólido (MARIANO, 1993). Testou-se a atividade contra fungos patógenos humanos e de plantas, listados na Tabela 2 e ilustrados na Figura 3.

TABELA 2: Linhagens referência de fungos patogênicos utilizados nos testes de atividade antifúngica e suas características de patogenicidade, procedência e condições de incubação

Patógenos	Doença causada	Procedência da linhagem	Condições de incubação
<i>Fusarium</i> sp. I51-2	Patógeno do milho	EMBRAPA (Recife, PE)	Meio BDA pH 6,8; 28 ^o C
<i>Trichoderma</i> sp. CNBP ₂ F ₁₆	Patógeno do café Catuaí	IAPAR (Londrina, PR)	Meio BDA pH 6,8; 28 ^o C
<i>Guignardia citricarpa</i> 3C	Mancha Preta em Citros (MPC)	Universidade de Oregon, EUA	Meio Completo pH 5,8; 28 ^o C
<i>Guignardia citricarpa</i> PC13	Mancha Preta em Citros (MPC)	IAC (Cordeirópolis, SP)	Meio Completo pH 5,8; 28 ^o C
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> Fp18	Cromoblastomicose em humanos	Hospital de Clínicas (Curitiba, PR)	Meio Sabouraud pH 5,6; 37 ^o C
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Candidíase em humanos	Hospital de Clínicas (Curitiba, PR)	Meio Sabouraud pH 5,6; 37 ^o C

FIGURA 3: Macromorfologia dos fungos patogênicos utilizados nos testes de atividade antifúngica



Legenda: A - *Fusarium* sp. I51-2; B - *Trichoderma* sp. CNBP2F16; C - *Guignardia citricarpa* PC3C -; D - *Guignardia citricarpa* PC13; E - *Fonsecaea pedrosoi* Fp18; F - *Candida albicans* ATCC 10231

Os actinomicetos e fungos endofíticos foram crescidos em placas de Petri com meio BDA (item 3.2.1), pH 6,8, a 28^oC, por 7 a 14 dias. Com o auxílio de um vazador de rolas, foram retirados cilindros de ágar de 5 mm de diâmetro, das bordas das colônias em crescimento. O mesmo procedimento foi adotado em relação aos fungos patogênicos, respeitando suas condições ótimas de cultura (Tabela 2). Um cilindro do endófito e outro do patógeno foram então transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura, e colocados em polos opostos equidistantes a 1 cm da borda interna da placa. Os testes foram todos realizados em triplicata e foram utilizadas como controles placas contendo cilindros somente do endófito e apenas do patógeno, em posições equivalentes às das testemunhas. As condições de cultura foram sempre favoráveis aos patógenos ensaiados

(Tabela 2). Após incubação, investigou-se a presença de halo de inibição do crescimento micelial do fungo patogênico em relação ao endófito.

As bactérias endofíticas foram inoculadas em 5 mL de Caldo Nutriente (item 3.2.8), por 18 a 22 horas, a 28^oC. Após este período, foram efetuadas riscas da cultura bacteriana com auxílio de alça de platina, sobre meio de cultura sólido em placa de Petri. Foram semeadas 4 bactérias por placa, distantes 1 cm da borda interna, formando um quadrado, porém com o cuidado para que as riscas não se encontrassem. Um cilindro de ágar contendo o micélio do patógeno previamente crescido foi colocado no centro das placas e, após incubação, investigou-se a presença de halo de inibição. Os testes foram realizados em triplicata e utilizadas como controles placas contendo somente as riscas das bactérias endofíticas e placas apenas com o patógeno, em posições equivalentes às das testemunhas. As condições de cultura foram sempre favoráveis aos patógenos ensaiados (Tabela 2).

3.4.3.2. Atividade antibacteriana em meio sólido

Para se observar a atividade antibacteriana das amostras de microrganismos endofíticos, foram empregadas duas metodologias descritas por MARIANO (1993). As linhagens referência, provenientes da ATCC (*American Type Culture Collection*), foram cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, e Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Tabela 3).

TABELA 3: Linhagens referência utilizadas nos testes de atividade antibacteriana

Linhagens referência	N^o. de registro	Instituição fornecedora
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Hospital de Clínicas (Curitiba, PR)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Hospital de Clínicas (Curitiba, PR)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Hospital de Clínicas (Curitiba, PR)
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa, PR)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	Hospital de Clínicas (Curitiba, PR)
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina (MRSA)	Linhagem hospitalar	Hospital de Clínicas (Curitiba, PR)

Os actinomicetos e fungos endofíticos foram crescidos em placas de Petri com meio BDA (item 3.2.1), pH 6,8, a 28^oC, por 7 a 14 dias. Com o auxílio de um vazador de rolhas, foram retirados cilindros de ágar de 5 mm de diâmetro das bordas das colônias em crescimento. Foram colocados quatro cilindros por placa, dispostos sobre uma camada de 15 mL de Ágar Müeller Hinton (item 3.2.7). Como controle foi utilizado um cilindro apenas com meio BDA. As linhagens referência foram inoculadas em 5 mL de Caldo Nutriente (item 3.2.8), sendo incubadas por 18 a 20 horas a 37^oC. Foram inoculados 0,1 mL da cultura crescida de cada bactéria em frascos com 10 mL de Ágar Müeller Hinton 0,85% (item 3.2.11), fundido a 45^oC. Esta mistura foi dispensada sobre a camada de 15 mL de Ágar Müeller Hinton solidificado, envolvendo os cinco cilindros anteriormente posicionados. Os testes foram realizados em triplicata. Como controles adicionais foram utilizadas placas apenas com a linhagem referência, sem os cilindros. As placas foram incubadas por 24 a 48 horas a 37^oC. Foi investigada a presença de halos de inibição de crescimento bacteriano.

As bactérias endofíticas foram inoculadas em 5 mL de Caldo Nutriente (item 3.2.8), por 18 a 22 horas, a 28^oC. O mesmo procedimento foi realizado com as linhagens referência, porém a 37^oC. Foram inoculados 0,1 mL da cultura crescida de cada linhagem referência em frascos com 25 mL de Ágar Müeller Hinton (item 3.2.7), fundido a 45^oC, e esta mistura foi dispensada em placas de Petri. Logo

após completa solidificação, foram efetuadas riscas das bactérias endofíticas, com auxílio de alça de platina, sobre o meio de cultura já contendo a patogênica. Foram semeadas 4 bactérias por placa, distantes 1 cm da borda interna, formando um quadrado, porém com o cuidado para que as riscas não se encontrassem. Os testes foram realizados em triplicata. Como controle foram preparadas placas contendo somente as riscas das bactérias endofíticas, sem o meio contendo a bactéria referência. Um controle adicional foi empregado, consistindo apenas de meio de cultura com a linhagem referência, sem as riscas das endofíticas.

3.4.3.3. Atividade antibacteriana por bioautografia

3.4.3.3.1. Fermentação líquida dos extratos brutos dos fungos

(RODRIGUES et al., 2000)

Foram obtidos extratos brutos dos fungos endofíticos que inibiram os patógenos nos ensaios de antagonismo, utilizando o solvente orgânico acetato de etila p.a. Primeiramente, o micélio foi crescido em placas de Petri contendo meio BDA (item 3.2.1) pH 6,8 por 7 a 15 dias em estufa a 28⁰C. Após este período, 3 cilindros de ágar de 5 cm de diâmetro, obtidos com auxílio de um vazador de rolhas, foram inoculados em um frasco do tipo erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de MEB (item 3.2.4) e incubados por 7 a 15 dias, a 28⁰C, em agitação a 120 rpm. O caldo (fase aquosa) foi filtrado a vácuo, em funil de porcelana e papel filtro previamente autoclavados, e transferido para funil de separação. Foi adicionado igual volume de acetato de etila, agitado vigorosamente e, depois de separadas as fases, foi coletada a fase aquosa (de baixo), enquanto a fase orgânica (de cima) foi reservada em frasco apropriado. Foi repetido o procedimento com a fase aquosa por mais duas vezes. À fase orgânica resultante foi adicionado sulfato de sódio anidro, até secar completamente o resíduo aquoso. Após filtrado, o extrato foi colocado em rotaevaporador até evaporação total do solvente, pesado e armazenado em freezer. O extrato bruto foi redissolvido em

metanol (MeOH, gradiente para HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) para a condução do bioensaio.

3.4.3.3.2. Bioautografia em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) pelo método *agar-overlay*

Após obtidos os extratos brutos dos fungos endofíticos, procedeu-se a investigação da atividade antibacteriana *in vitro* pela técnica de bioautografia em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) pelo método *agar-overlay* (RAHALISON et al., 1991). Inicialmente as linhagens referência (Tabela 2) foram inoculadas em caldo Müeller Hinton para reativar as culturas e para checar a viabilidade e a pureza dos microrganismos-teste. Foram preparadas diluições seriadas até 10^{-7} em tubos de ensaio com solução salina a 0,85% (item 3.3.20). Uma alíquota de 100 μ L foi retirada da diluição 10^{-6} , e transferida para outro tubo contendo 10 mL de caldo Müeller Hinton, homogeneizada em vortex e incubada a 37^oC por 48 horas. Foram preparadas as placas de cromatografia fina ou de camada delgada (CCD, 20 X 20 cm), cortando-se em quadrados 6 X 6 cm, e dividindo-os em 4 quadrados de 1,5 cm cada. No canto superior esquerdo foi realizado um pequeno corte para referência. Os extratos dissolvidos em metanol na concentração final de 10 mg/mL foram aplicados em duplicata na placa, nas quantidades de 5 e 10 μ L, um extrato por fileira. A quarta e última linha foi reservada para o controle positivo, uma solução alcoólica de cloranfenicol de 20 mg/mL. Foi utilizada uma placa para cada microrganismo-teste. Para adicionar a linhagem referência, foram utilizados tubos com 10 mL de ágar Müeler Hinton fundido mantidos em banho-maria a 50^oC. Foram inoculados nestes tubos 100 μ L da bactéria referência, homogeneizados em vortex e seu conteúdo dispensado sobre a placa de CCD, contendo os extratos e o controle. As placas foram deixadas entreabertas em fluxo laminar até a completa solidificação do meio, depois tampadas (sem vedação) e mantidas nesta posição durante incubação em estufa a 37^oC por 24 horas. As placas foram borrifadas com solução aquosa de MTT (2,5 mg/mL) e novamente incubadas por uma a duas horas a 37^oC. O

resultado da atividade foi detectado por meio da formação de um halo de inibição esbranquiçado contra um fundo roxo, podendo ser medido o diâmetro deste halo e expresso em milímetros.

3.4.4. Obtenção de colônias monospóricas

Para obtenção de colônias monospóricas, os fungos endofíticos foram inoculados em meio BDA (item 3.2.1), pH 6,8, a 28^oC. Após 10 a 14 dias, com auxílio de um bisturi esterilizado, o micélio foi coletado e imerso em 5 mL de solução de *tween 80* a 0,1% (item 3.3.19), macerado com bastão de vidro esterilizado, filtrado em seringa com lã de vidro autoclavada, lavado com solução salina a 0,85% (item 3.3.20) e coletado em tubo tipo Falcon de 15 mL. O volume foi completado para 14 mL com solução salina a 0,85%. A solução foi centrifugada a 3500 rpm por 4 minutos, descartando-se o sobrenadante e suspendendo-se o precipitado com 500 µL de solução salina a 0,85%. Em Câmara de Neubauer foram contados os esporos e a suspensão foi diluída até conter 10⁶ a 10⁷ esporos por mL. Inocularam-se 100 µL da solução de esporos em quatro placas de Petri, incubando-se em estufa a 28^oC. Ao germinarem os esporos procedeu-se o isolamento de colônias monospóricas para posterior extração de DNA.

3.4.5. Extração de DNA

DNA de isolados endófitos foram extraídos utilizando o protocolo de RAEDER e BRODA (1985), modificado por BLANCO (1999), adaptando-o quando necessário. Com auxílio de uma espátula esterilizada, o micélio foi coletado em solução de *tween 80* a 0,1% (item 3.3.19) e aproximadamente 10⁶ a 10⁷ esporos foram inoculados em 100 mL de Meio Completo Líquido (item 3.2.10) e mantidos sob agitação (120 rpm), a 28^oC, por dois a três dias. O micélio crescido foi filtrado a vácuo, liofilizado, triturado com adição de nitrogênio líquido e colocado em tubos para microcentrifuga. A cada grama de micélio foram acrescentados 4 mL de

Tampão de Extração (item 3.3.12). Após agitação em vortex, os tubos foram imersos por 15 a 20 minutos em banho-maria a 70°C. Um volume de fenol saturado foi acrescentado, as fases misturadas e os tubos centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada em tubos limpos, adicionado a esta um volume de Clorofane (item 3.3.2), as fases misturadas e os tubos novamente centrifugados. O mesmo procedimento foi adotado para a adição de um volume de Clorofil (item 3.3.1). À fase aquosa foram adicionados vagorosamente dois volumes de etanol P.A. resfriado a -20°C. Os tubos foram mantidos a -20°C por 1 hora, centrifugados a 10000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 500µL de etanol 70% e os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados para a secagem do *pellet*. O DNA foi ressuscitado cuidadosamente em 200 µL de tampão TE (item 3.3.13). Foi adicionada RNase (50 µg/mL) (item 3.3.7), e os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por uma hora. O tratamento com Clorofil (item 3.3.1) foi repetido, seguido da adição de 10% de acetato de sódio 3M, precipitação com etanol absoluto, lavagem com etanol 70%, secagem do *pellet* e ressuspensão em 200 µL de tampão TE. O DNA foi quantificado e sua integridade verificada em gel de agarose a 0,8% (item 3.3.5), utilizando-se o padrão de peso molecular fago lambda Hind III.

3.4.6. Análise da variabilidade genética por RAPD

Inicialmente foi otimizada a reação de amplificação, testando as concentrações de DNA e cloreto de magnésio. Foram ensaiadas concentrações de DNA de 25 a 200 ng/reação, concentrações de cloreto de magnésio de 2, 3 e 4 mM e foram selecionados os oligonucleotídios. Para cada reação foram adicionados: água milli-Q autoclavada; tampão PCR 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 10 pMol de oligonucleotídeo; 3 mM de MgCl₂; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase; e 50 ng de DNA, totalizando um volume final de 25 µL. Foi utilizado o termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient®) sendo cada reação submetida a 40 ciclos após desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos. Cada ciclo consistiu de 1 minuto a

94⁰C, 1 minuto e 30 segundos a 37⁰C e 2 minutos a 72⁰C. Ao término dos 40 ciclos realizou-se uma extensão final de 3 minutos a 72⁰C.

Para a análise do polimorfismo, os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% (item 3.3.6), corados por 15 minutos com solução de Brometo de Etídio (item 3.3.8), observados em transiluminador de UV e fotodocumentados. O DNA *ladder* de 100 pb foi utilizado como marcador de peso molecular.

A análise da variabilidade genética foi realizada agrupando as linhagens segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Foi utilizado o coeficiente de similaridade Jaccard, que permite calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de banda), segundo a fórmula $J = M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis (bandas) menos o número de concordâncias negativas. As unidades (linhagens) foram agrupadas por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), modelo de agrupamento hierárquico que permite a construção de dendrogramas (SNEATH; SOKAL, 1973).

As matrizes e os dendrogramas foram elaborados com auxílio do programa NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy System of Multivariate*) (ROHLF, 1988). A partir do dendrograma foi gerada uma matriz cofenética com auxílio do programa NTSYS, que foi comparada pelo teste de correlação de matrizes de Mantel, com a matriz de similaridade inicialmente obtida com os marcadores RAPD.

A confiabilidade dos agrupamentos dos dendrogramas foi testada por meio de análise *bootstrap* com 10000 reamostragens, segundo FELSENSTEIN (1985), utilizando o *software Bood v3.04* (COELHO, 2005). Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 70%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap*.

Foi realizada uma análise de variância dos marcadores RAPD (AMOVA) utilizando o *software Arlequin* (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

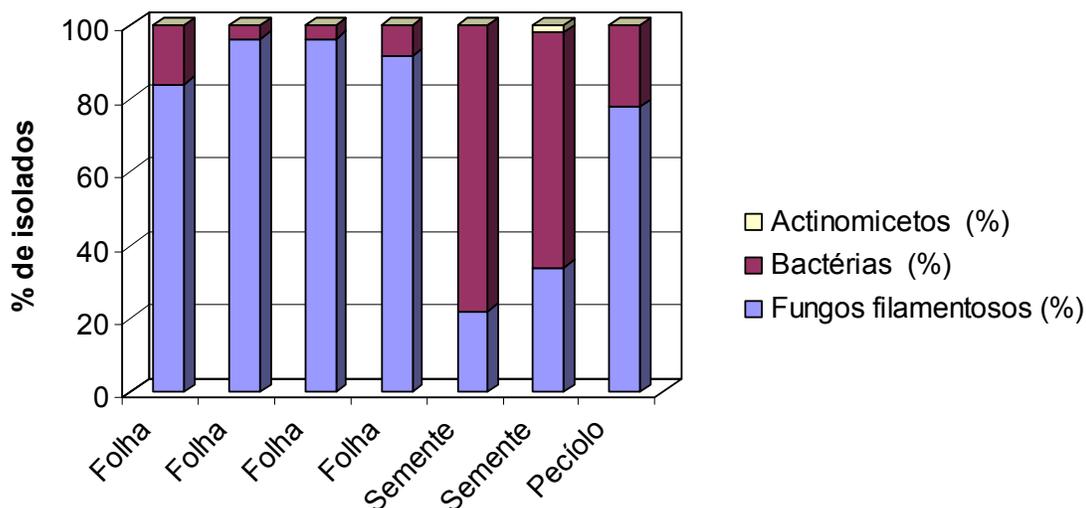
4.1. Isolamento de microrganismos endofíticos de espinheira-santa

Foram isolados no total 915 endófitos de diferentes tecidos da planta espinheira-santa, entre eles 793 fungos filamentosos, 1 actinomiceto e 121 bactérias. A Tabela 4 e a Figura 4 comparam os resultados obtidos quanto à proporção de cada tipo de microrganismo sobre o total de isolados, nas sete coletas realizadas.

TABELA 4: Porcentagem de microrganismos endofíticos isolados de espinheira-santa em sete períodos de coleta

Coleta	Órgão da planta	Fungos filamentosos (%)	Bactérias (%)	Actinomicetos (%)
1	folhas	83,82	16,18	0
2	folhas	96,18	3,82	0
3	folhas	96,26	3,74	0
4	folhas	91,57	8,43	0
5	sementes	22,00	78,00	0
6	sementes	33,96	64,15	1,89
7	pecíolos	77,78	22,22	0

FIGURA 4: Porcentagem de microrganismos endofíticos isolados de espinheira-santa em cada isolamento



Observando a Figura 4, pode-se concluir que nos isolamentos de folhas e pecíolos de espinheira-santa, os fungos filamentosos foram mais frequentes do que as bactérias. Já em sementes ocorreu o inverso, sendo predominante o isolamento de bactérias. Estes resultados estão de acordo com PETRINI, STONE e CARROL (1982), que observaram a ocorrência de transmissão horizontal de fungos pelo ar (*air-borne fungi*) em plantas lenhosas, enquanto em gramíneas (POACEAE) foi relatada a transmissão vertical, isto é, via semente. Segundo SOUZA (2004), as folhas dos vegetais hospedeiros devem ser provavelmente a primeira porta de entrada para os microrganismos, pois apresentam tecidos mais frágeis e expostos pela presença dos estômatos, ocorrendo posteriormente a migração para os outros tecidos da planta. Deve-se destacar que provavelmente houve outros fatores que resultaram em uma ocorrência maior de fungos isolados a partir de folhas do que sementes e pecíolos. Primeiramente, o número de coletas e isolamentos de folhas foi maior (quatro) do que em sementes (dois) e pecíolos (um). Em segundo lugar, fatores como o número maior de fragmentos testados e os meios de cultura utilizados, podem ter favorecido o crescimento de fungos em relação às bactérias e actinomicetos. Nos pecíolos, apesar de menor variedade de morfotipos do que nas folhas, os microrganismos ali presentes

podem ser considerados como endófitos mais potencialmente colonizadores e mais competitivos no interior da planta.

No isolamento 4, foi utilizada somente a temperatura de incubação de 18°C, e o meio AC, visando aumentar o número de actinomicetos isolados. Os actinomicetos são freqüentemente relatados na literatura como produtores de substâncias antimicrobianas (ARAÚJO, SILVA e AZEVEDO, 2000; CASTILLO et al., 2002; PULLEN et al., 2002). Mesmo modificando a metodologia, não se obteve isolamento de nenhum actinomiceto endofítico de folha, nem pecíolo, apenas de semente de espinheira-santa.

4.1.1. Isolamento e identificação de fungos endofíticos

Foram isolados 743 fungos endofíticos nas quatro coletas de folhas, 21 de pecíolos e 29 nos dois isolamentos de sementes, totalizando 793 endófitos (Tabela 5).

Considerando as características morfológicas das colônias e a observação de microcultivo em microscópio ótico, foi possível sugerir a identificação de alguns isolados de fungos ao nível de gênero. As Figuras 5 a 10 mostram a macro e micromorfologia de seis gêneros de fungos já identificados.

Cerca de 60% dos isolados fúngicos não produziram estruturas de reprodução em meio de cultura, nas condições utilizadas neste trabalho, e portanto não puderam ser identificados. No entanto, foram agrupados segundo características macroscópicas em outros 13 grupos (Tabela 5 e Figura 11).

Na Tabela 5 pode-se perceber a predominância do grupo I entre os fungos isolados de sementes de espinheira-santa. Tal grupo é composto por fungos de micélio algodinoso, de coloração branca e taxa rápida de crescimento. O mesmo grupo foi também o mais freqüente a partir de folhas e pecíolos, reforçando a natureza endofítica dos isolados. Dentro deste grupo, três isolados puderam ser identificados como *Pestalotiopsis* sp. (SD01, SD07 e SV12), gênero freqüentemente citado na literatura como produtor de compostos bioativos

(RODRIGUES; HESSE; WERNER, 2000; LI ; STROBEL, 2001; STROBEL et al., 2002).

Em folhas de espinheira-santa, os gêneros isolados com maior frequência foram: *Alternaria* sp. (28%), *Colletotrichum* sp. (6,1%), *Bipolaris* sp. (3,2%), *Guignardia* sp. (1,6%) e *Cladosporium* sp. (1,1%). Em pecíolos, foram isolados os gêneros *Alternaria* sp. (9,5%) e *Cladosporium* sp. (4,7%), e em sementes *Cladosporium* sp. (13,3%) e *Pestalotiopsis* sp. (10%).

O gênero *Colletotrichum* é um dos endófitos isolados com maior frequência a partir de diversas plantas hospedeiras. Foi considerado dominante em *Citrus* (ARAÚJO et al., 2001), gengibre (BUSSABAN et al., 2001), maçã (CAMATTI-SARTORI et al., 2005), café (SANTAMARIA; BAYMAN, 2005), e ainda nas plantas medicinais *Artemisia annua* (Anacardiaceae) (LU et al.,2000), *Artemisia mongolica* (Asteraceae) (ZOU et al., 2000), *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae) (MAGALHÃES, 2001), *Heterosmilax japonica* (GAO et al., 2005).

Neste trabalho o gênero *Colletotrichum* não é o dominante, mas foi constatada especificidade deste endófito por tecido, ou melhor, preferência por folhas. O mesmo ocorreu com relação a *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp. e *Guignardia* sp. Já *Cladosporium* sp. foi isolado de todos os tecidos de espinheira-santa.

TABELA 5: Número de isolados de fungos endofíticos pertencentes a 6 gêneros e 13 grupos morfológicamente distintos, a partir de folhas, pecíolos e sementes de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*)

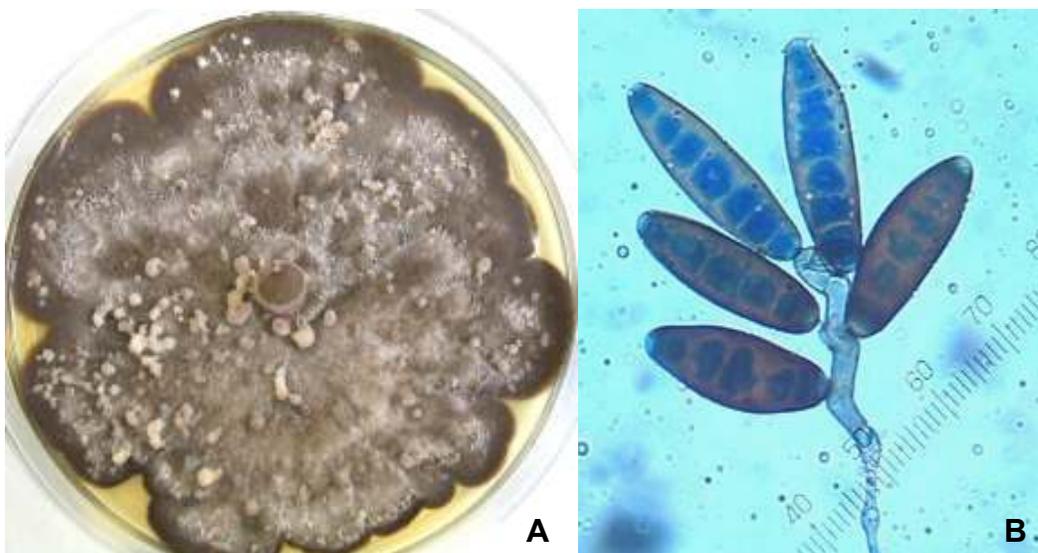
GÊNEROS	FOLHAS	PECÍOLOS	SEMENTES	TOTAL
<i>Alternaria</i> sp.	209	2	0	211
<i>Colletotrichum</i> sp./ <i>Glomerella</i> sp.	45	0	0	45
<i>Bipolaris</i> sp.	24	0	0	24
<i>Cladosporium</i> sp.	8	1	4	13
<i>Phyllosticta</i> sp./ <i>Guignardia</i> sp.	12	0	0	12
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0	0	3	3
FUNGOS NÃO IDENTIFICADOS	FOLHAS	PECÍOLOS	SEMENTES	TOTAL
I – micélio algodonoso, coloração branca; taxa de crescimento rápido	246	5	14	265
II – micélio compacto, coloração marrom; taxa de crescimento lento	83	0	4	87
III – micélio aveludado, coloração acinzentada; taxa de crescimento lento	41	2	0	43
IV – micélio felpudo, coloração branca; taxa de crescimento rápido	26	5	0	31
V – micélio compacto, coloração acinzentada; taxa de crescimento lento	20	0	0	20
VI – micélio compacto, coloração branca; taxa de crescimento lento	7	1	2	10
VII – micélio compacto, coloração verde-clara; taxa de crescimento lento	2	5	2	9
VIII – micélio aveludado, coloração marrom; taxa de crescimento lento	7	0	0	7
IX – micélio aveludado, coloração branca; taxa de crescimento rápido	7	0	0	7
X – micélio compacto, com bordos irregulares, coloração acinzentada e branca; taxa de crescimento rápido	3	0	0	3
XI – micélio de coloração branca, com esporulação escura; taxa de crescimento rápido	1	0	0	1
XII – micélio compacto, aveludado, coloração verde-clara, produção de pigmento esverdeado em meio BDA; taxa de crescimento lento	1	0	0	1
XIII – micélio compacto, com bordos irregulares, coloração salmão, produção de pigmento marrom em meio BDA; taxa de crescimento lento	1	0	0	1
TOTAL	743	21	29	793

FIGURA 5: Macro e micromorfologia de *Alternaria* sp., isolado AD99



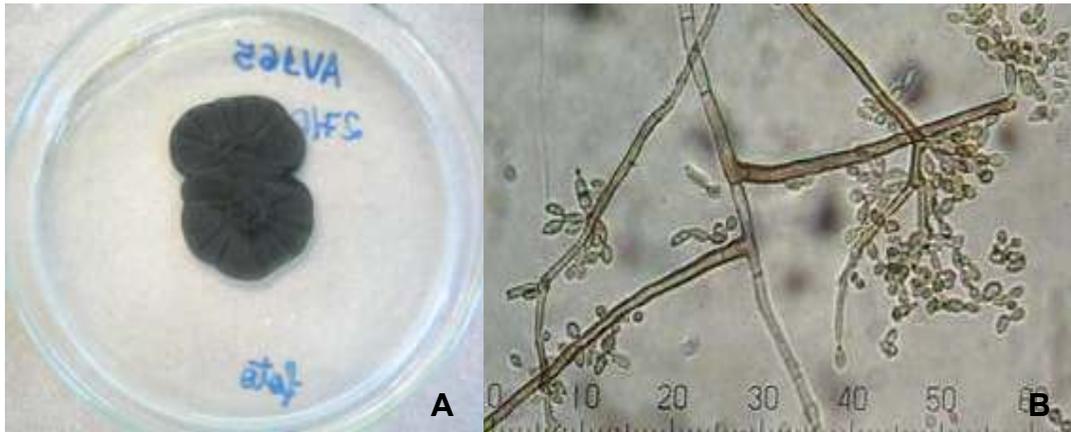
A: Macromorfologia após 15 dias de crescimento em meio Sabouraud a 28°C. B: Micromorfologia de conídios, após 15 dias de crescimento em microcultivo em meio BDA a 28°C; coloração lactofenol azul de algodão; aumento de 400 X

FIGURA 6: Macro e micromorfologia de *Bipolaris* sp., isolado FV123



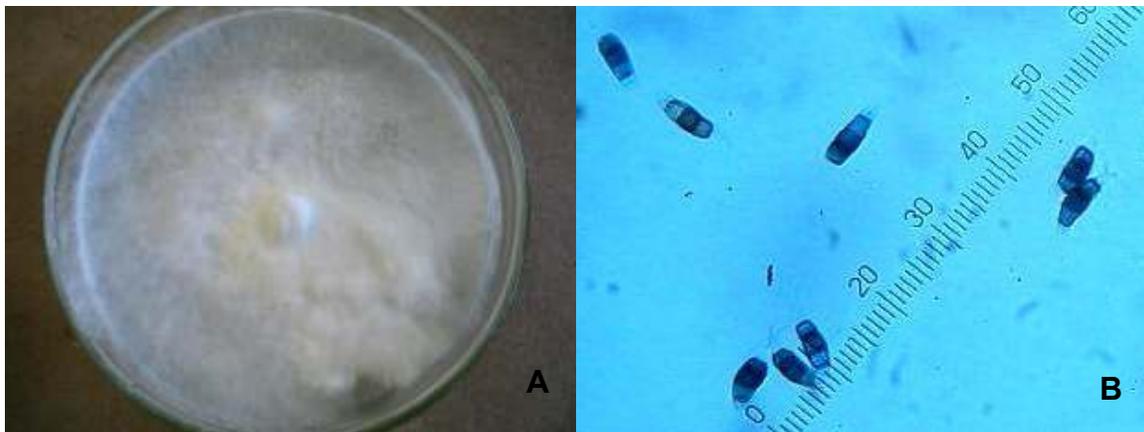
A: Macromorfologia após 15 dias de crescimento em meio Sabouraud a 28°C. B: Micromorfologia de conídios e conidióforo, após 15 dias de crescimento em microcultivo em meio BDA a 28°C; coloração lactofenol azul de algodão; aumento de 400 X

FIGURA 7: Macro e micromorfologia de *Cladosporium* sp., isolado AV165



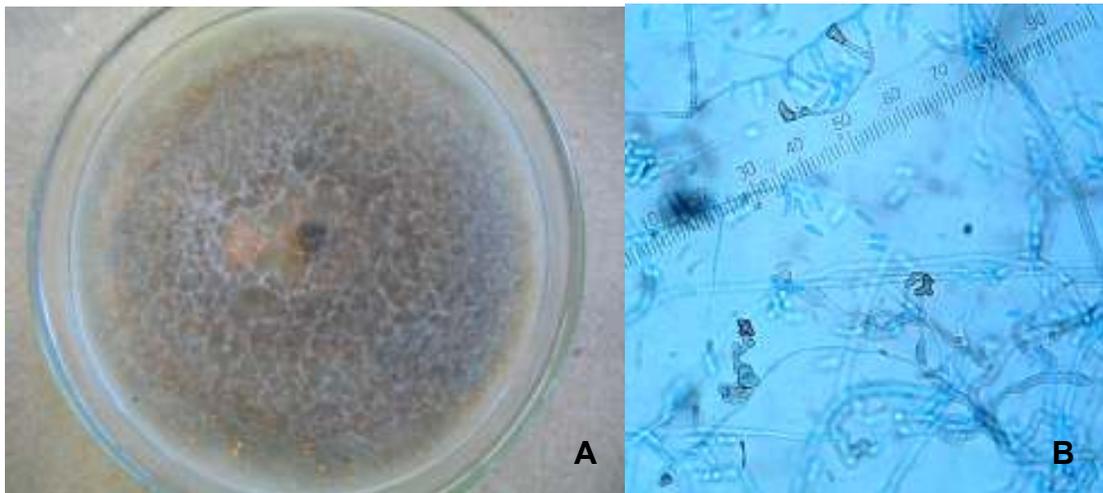
A: Macromorfologia após 15 dias de crescimento em meio BDA a 28°C. B: Micromorfologia de conídios e conidióforos, após 15 dias de crescimento em microcultivo em meio BDA a 28°C; coloração lactofenol azul de algodão; aumento de 400 X

FIGURA 8: Macro e micromorfologia de *Pestalotiopsis* sp., isolado SD07



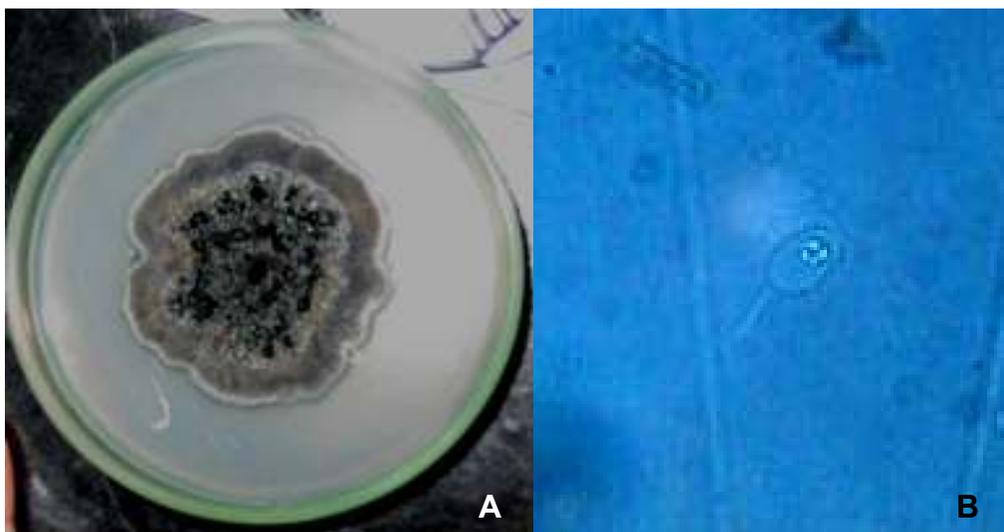
A: Macromorfologia após 15 dias de crescimento em meio BDA a 28°C. B: Micromorfologia de conídios, após 15 dias de crescimento em microcultivo em meio BDA a 28°C; coloração lactofenol azul de algodão; aumento de 400 X

FIGURA 9: Macro e micromorfologia de *Colletotrichum* sp., isolado COL13



A: Macromorfologia após 15 dias de crescimento em meio Sabouraud a 28°C. B: Micromorfologia de conídios e apressórios, após 15 dias de crescimento em microcultivo em meio BDA a 28°C; coloração lactofenol azul de algodão; aumento de 400 X

FIGURA 10: Macro e micromorfologia de *Phyllosticta capitalensis* (*Guignardia mangiferae*), isolado 79



A: Macromorfologia após 24 dias de crescimento em meio BDA a 28°C. B: Micromorfologia de conídio, após 24 dias de crescimento em meio BDA a 28°C, mostrando apêndice mucilaginoso; coloração lactofenol azul de algodão; aumento 400 X.

FIGURA 11: Macromorfologia dos grupos de fungos endofíticos isolados de espinheira-santa em diferentes meios de cultura, pH e período de crescimento.



Grupo I - SV05
BDA; pH 6,8; 19 dias



Grupo III - FV127
MC; pH 5,8; 31 dias



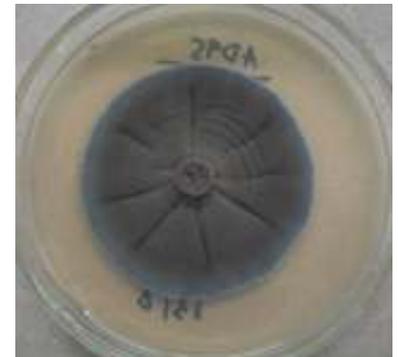
Grupo IV - FV32
MC; pH 5,8; 8 dias



Grupo V - 42
BDA; pH 6,8; 31 dias



Grupo VI - AV106
BDA; pH 6,8; 19 dias



Grupo VIII - AD95
MC; pH 5,8; 31 dias



Grupo IX - FV136
MC; pH 5,8; 14 dias



Grupo XII - FV113
MC pH 5,8 14 dias



Grupo XVIII - FAC32
BDA; pH 6,8; 31 dias

4.1.2. Isolamento e identificação de bactérias endofíticas

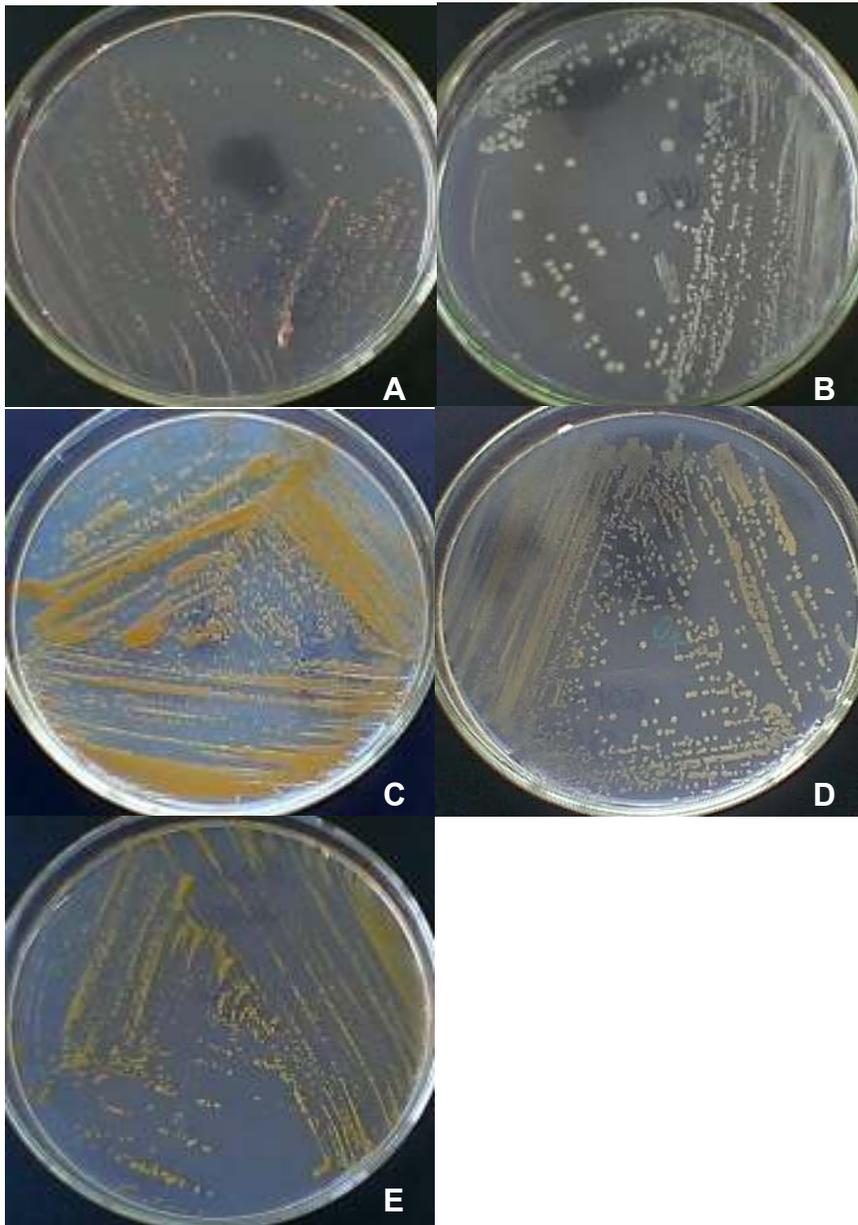
Foram isoladas 42 bactérias endofíticas nos quatro isolamentos a partir de folhas, 6 de pecíolos e 73 nos dois isolamentos de sementes, totalizando 121 endófitos. Estes foram agrupados em seis morfotipos, cinco deles mostrados na Figura 12. A Tabela 6 reúne os morfotipos, baseados em características macroscópicas e coloração de Gram.

Na Tabela 6 observa-se maior proporção de isolamento de bacilos Gram negativos de coloração rosada, tanto em folhas, como pecíolos e sementes. É possível que sejam transmitidas pela semente (transmissão vertical), podendo colonizar a planta desde as primeiras fases de crescimento, revelando uma interação bem estabelecida com a sua hospedeira e talvez vantajosa para ambas. PENNA (2002) também isolou bactérias semelhantes, de colônias de coloração vermelho-rosada, como endofíticas de sementes de erva-mate, porém observou uma maior frequência de Gram positivas (80%).

TABELA 6: Morfotipos das bactérias endofíticas isoladas de sementes de espinheira-santa

Morfotipos	Macromorfologia	Micromorfologia	FOLHAS	PECÍOLOS	SEMENTES	TOTAL
1	Colônia puntiforme, de coloração rosada, circular, lisa, convexa baixa, cremosa, opaca, brilhante	bacilo gram negativo	16	4	29	49
2	Colônia puntiforme, de coloração branca, circular, lisa, convexa baixa, cremosa, opaca, brilhante	estafilococo	9	0	12	21
3	Colônia puntiforme, de coloração alaranjada, circular, lisa, convexa baixa, cremosa, opaca, brilhante	bacilo gram negativo	6	0	9	15
4	Colônia puntiforme, de coloração beje, circular, lisa, convexa alta, cremosa, opaca, brilhante	bacilo gram negativo	2	1	7	10
5	Colônia puntiforme, de coloração amarela ouro, circular, lisa, convexa alta, cremosa, opaca, brilhante	bacilo gram negativo	4	1	5	10
6	Colônia puntiforme, de coloração branca, circular, bordos ondulados, convexa alta, cremosa, translúcida, brilhante	bacilo gram negativo	5	0	11	16
TOTAL			42	6	73	121

FIGURA 12: Macromorfologia de cinco morfotipos de bactérias isoladas de espinheira-santa.



Legenda: A – Morfotipo 1; B - Morfotipo 2; C – Morfotipo 3; D – Morfotipo 4; E – Morfotipo 5; crescimento em meio NA, a 28°C, por 24 horas.

Considerando os dois isolamentos de sementes de espinheira-santa, foram plaqueados no total 800 fragmentos e obtidos 103 isolados, o que representa uma porcentagem de isolamento de aproximadamente 12,8%, mais elevada que a encontrada por PENNA (2000), que observou a freqüência de 9,6% de microrganismos isolados de sementes de erva-mate. CARROLL (1988) citou que, entre os vegetais superiores, apenas em gramíneas é comum a ocorrência de transmissão de endófitos via sementes, tanto de fungos (SCHARDL, 2001; SCOTT, 2001), como de bactérias, estas em maior proporção, devido à colonização durante o próprio processo de formação da semente (transmissão vertical), dependendo principalmente do tipo de membrana que a protege (HALLMANN et al., 1997). De plantas cítricas, por exemplo, não foram isolados endófitos de sementes por ARAÚJO et al. (2001) nem por GLIENKE-BLANCO et al. (2002).

4.3. Estudo do antagonismo dos isolados contra patógenos

Para os ensaios de antagonismo, foram utilizados 109 isolados endofíticos (39 fungos e 70 bactérias), selecionados ao acaso e procurando abranger todos os grupos ou morfotipos caracterizados na amostra. Por esta metodologia, ainda foram testadas 16 linhagens monospóricas de *Colletotrichum* sp., gênero selecionado para a análise de variabilidade genética por meio de marcadores RAPD (Tabela 7).

TABELA 7: Microrganismos endofíticos de espinheira-santa selecionados para os testes de antagonismo contra fungos patógenos humanos e de plantas.

Fungos endofíticos	Bactérias endofíticas	Linhagens monospóricas de <i>Colletotrichum</i> spp.	
COL13	S1	SD02	COL1
AD95	S3	SD03	COL2
AD99	S4	SD04	COL3
AV70	S5	SD05	COL4
AV106	S6	SD06	COL5
AV165	S7	SD09	COL6
FD21	S13	SD10	COL7
FD62	S14	SD11	COL8
FD75	S15	SD13	COL9
FD76	S16	SD14	COL10
FD86	S17	SD15	COL11
FD90	S18	SD16	COL12
FV06	S19	SD17	COL13
FV12	S20	SD18	COL14
FV20	S21	SD19	COL15
FV28	S22	SD20	COL16
FV32	S23	SD21	
FV92	S24	SD22	
FV112	S25	SD23	
FV113	S29	SD24	
FV123	S30	SD28	
FV127	S31	SD30	
FV136	S32	SV02	
FV138	S33	SV04	
FV143	S34	SV07	
FV146	S35	SV08	
42	S36	SV09	
79	S37	SV14	
SD01	S38	SV15	
SD07	S40	SV16	
SD26	S41	SV17	
SD27	S42	SV18	
SD31	S43		
SD32	S44		
SV03	S45		
SV05	S46		
SV10	S47		
SV12	S50		
SV20			

4.3.1. Atividade antifúngica em meio sólido

Nos testes de antagonismo dos microrganismos endofíticos selecionados contra patógenos de plantas, observou-se produção de halo de inibição de um fungo denominado FV113, isolado de folha, frente à linhagem I51-2 de *Fusarium* sp (Figura 13). Outro isolado fúngico, FAC32, inibiu o crescimento do mesmo patógeno (Figura 14). Estes endófitos não produziram esporos ou corpos de frutificação em placas e lâminas de microcultivo e não puderam ser identificados. Três bactérias endofíticas isoladas de sementes inibiram este mesmo patógeno, S1 (Figura 15) S4 e S24 (Figura 16). A bactéria antagonista S1 foi identificada como *Enterobacter cloacae* e S4 e S24 como *Staphylococcus* sp. HINTON e BACON (1995) também observaram atividade antagonista de *Enterobacter cloacae*, isolada endofiticamente de milho, contra *Fusarium moniliforme*.

FIGURA 13: Antagonismo contra o fungo patogênico de milho *Fusarium* sp., linhagem I51-2; halo de inibição frente ao fungo endofítico FV113.

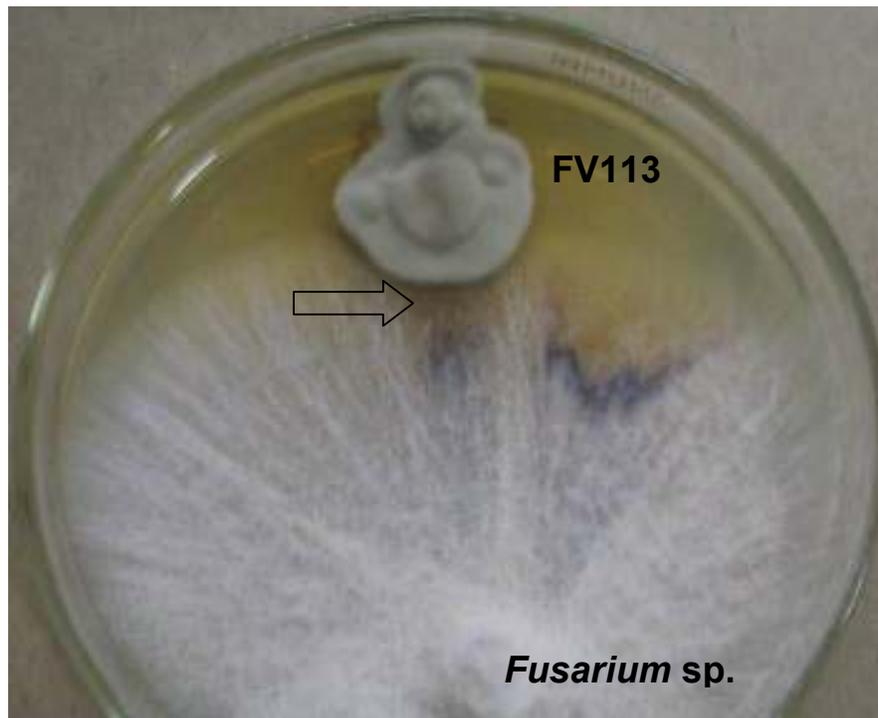


FIGURA 14: Antagonismo contra o fungo patogênico de milho *Fusarium* sp., linhagem I51-2; halo de inibição frente ao fungo endofítico FAC32.

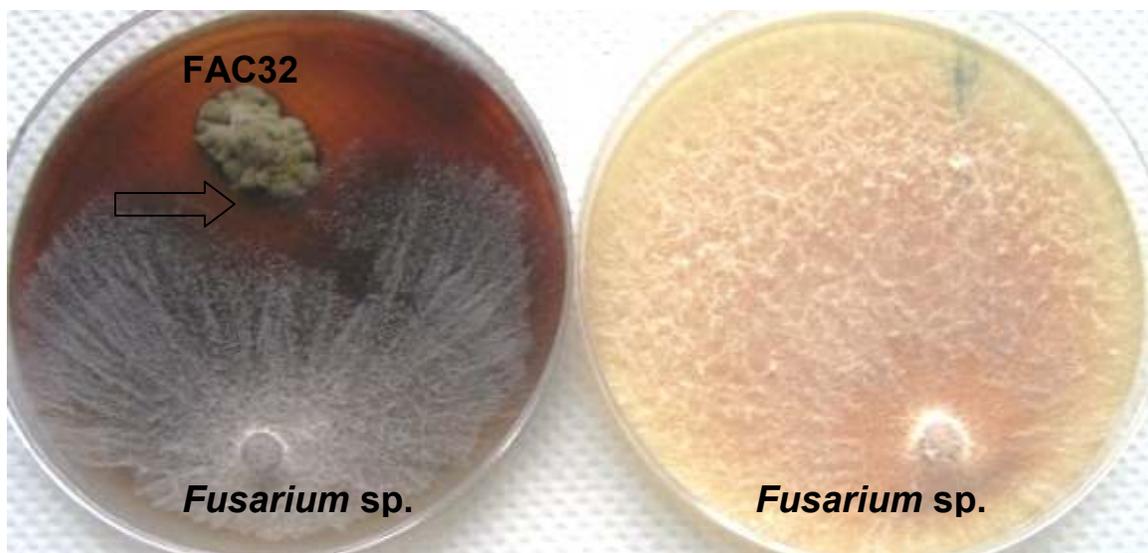


FIGURA 15: Antagonismo contra o fungo patogênico de milho *Fusarium sp.*, linhagem I51-2; halo de inibição frente à bactéria endofítica S1.

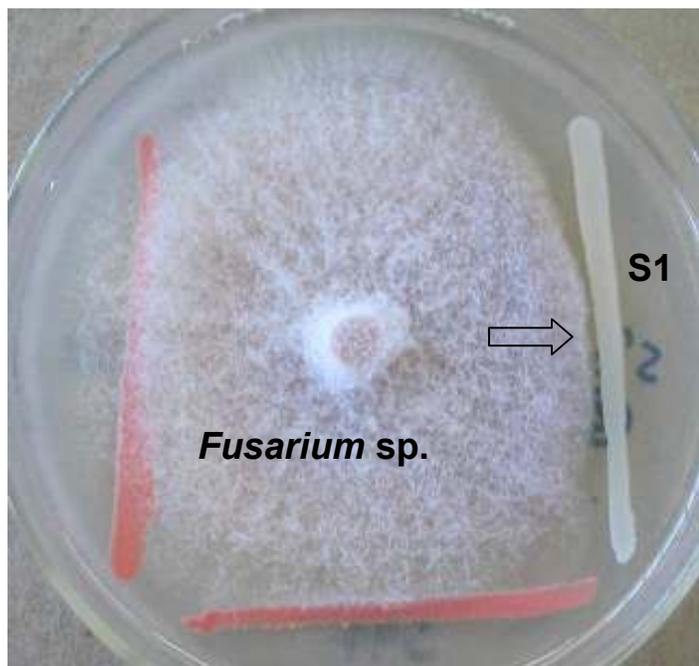
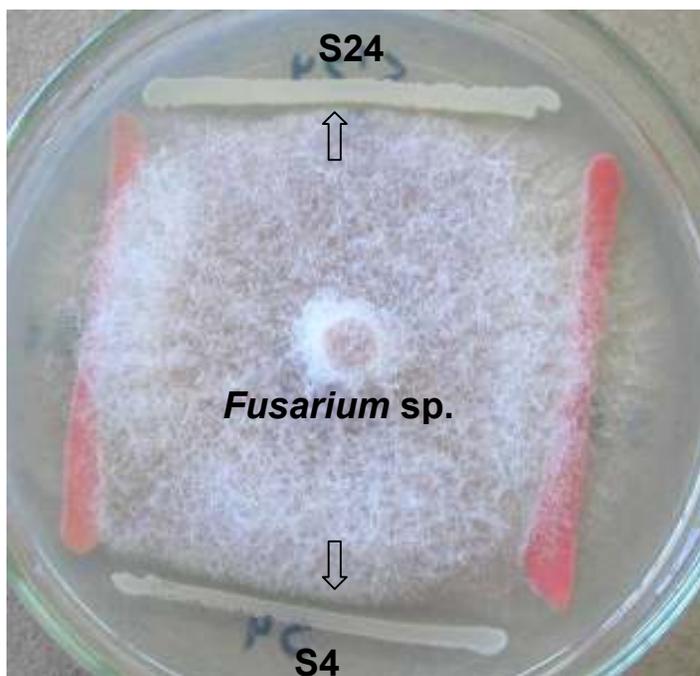


FIGURA 16: Antagonismo contra o fungo patogênico de milho *Fusarium sp.*, linhagem I51-2; halo de inibição frente às bactérias endofíticas S4 e S24.



O antagonismo contra o fungo *Fusarium* sp., patógeno da cultura de milho, foi relatado por BACON et al. (2001), utilizando uma bactéria endofítica, *Bacillus subtilis*. Os autores ressaltaram a importância destes resultados, já que esta bactéria ocupa o mesmo nicho dentro da planta, e pode ser considerada uma homóloga ecológica do fungo *Fusarium moniliforme*, e o mecanismo biológico inibitório, independente do modo de ação, deve operar segundo o princípio da exclusão competitiva. Além desta bactéria, uma espécie de *Trichoderma* demonstrou resultados promissores quanto à inibição de crescimento do referido patógeno.

WICKLOW et al. (2005) observaram uma relação antagonística do fungo endofítico de milho *Acremonium zeae* contra *Fusarium verticillioides*. Nos ensaios em placas com meio BDA, dois entre treze isolados de *A. zeae* (NRRL 6415 e NRRL 34556) inibiram o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*.

CAO et al. (2005) constataram antagonismo de actinomicetos contra o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, destacando-se a linhagem S96 de *Streptomyces* sp., que mostrou resultados promissores em ensaios de controle biológico *in vivo*.

TAECHOWISAN et al. (2005) também verificaram antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, patógeno de banana e trigo, frente ao actinomiceto *Streptomyces aureofaciens*, tanto em placa de Petri, por pareamento, como por testes de atividade do filtrado e do extrato do endófito.

Como pode ser observado na Figura 17, em relação ao patógeno de café *Trichoderma* sp., linhagem CNBP₂F₁₆, foi verificada produção de halo de inibição frente a um fungo denominado FV123, identificado como *Bipolaris* sp. O mesmo foi observado frente a um isolado de semente, SD26 (Figura 18), possivelmente um actinomiceto, e ainda frente a um fungo isolado de semente, SV05 (Figura 19), não identificados. Entre as bactérias endofíticas testadas, nenhuma inibiu o crescimento de *Trichoderma* sp.

FIGURA 17: Antagonismo contra o fungo patogênico de café *Trichoderma* sp., linhagem CNBP₂F₁₆, halo de inibição frente ao fungo endofítico *Bipolaris* sp.

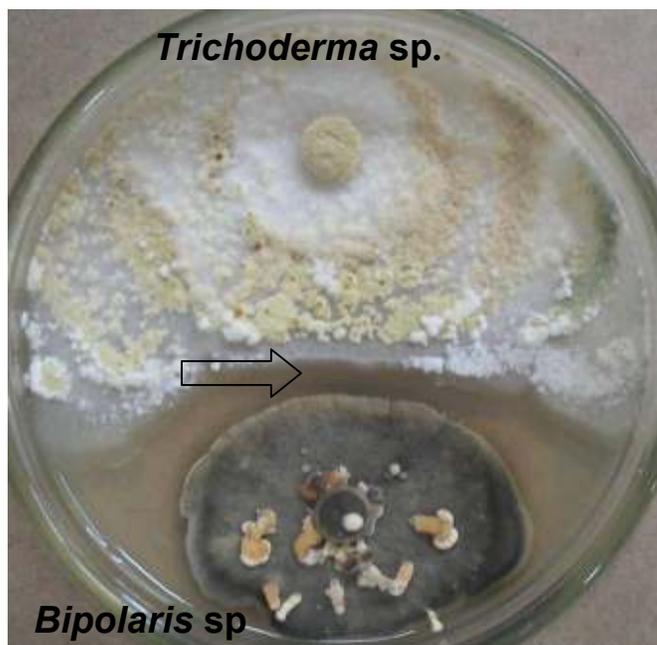


FIGURA 18: Antagonismo contra o fungo patogênico de café *Trichoderma* sp., linhagem CNBP₂F₁₆; halo de inibição frente a SD26.

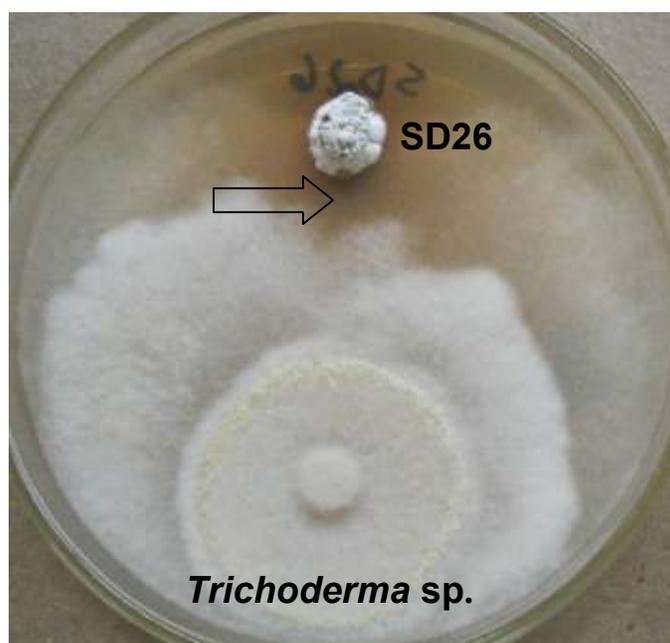
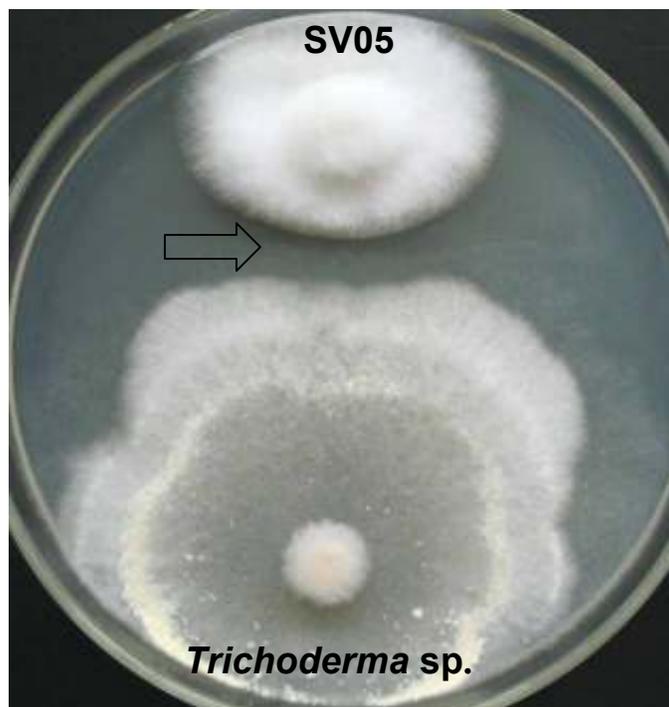


FIGURA 19: Antagonismo contra o fungo patogênico de café *Trichoderma* sp., linhagem CNBP₂F₁₆; halo de inibição frente ao fungo isolado de semente SV05.



Os resultados de antagonismo contra o patógeno de café *Trichoderma* sp. contrariam os dados da literatura, em que normalmente o *Trichoderma* é o agente controlador biológico de fungos patogênicos, e não o patógeno inibido.

BENÍTEZ et al. (2004) publicaram uma revisão sobre os mecanismos de biocontrole de linhagens de *Trichoderma*, atribuindo seu sucesso a diversas características peculiares destes fungos, como uma alta capacidade reprodutiva, capacidade de sobreviver sob condições bastante desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera, forte agressividade contra o fungo fitopatogênico, e eficiência em promover o crescimento da planta e mecanismos de defesa. Tais características de alta patogenicidade deste fungo tornam os resultados obtidos neste trabalho ainda mais interessantes e merecedores de investigação mais aprofundada, como por exemplo, a mudança na taxa de esporulação do fitopatógeno na presença destes endófitos.

Os resultados do antagonismo contra *Guignardia citricarpa* PC13 revelaram inibição de crescimento frente aos endófitos *Cladosporium* sp. (Figuras 20); AV106 (Figura 21); FD90 (Figura 22); FV113 (Figuras 23); e FV138 (Figura 24), fungos não identificados. As bactérias endofíticas não apresentaram capacidade de inibir *in vitro* o crescimento deste importante patógeno de plantas cítricas.

FIGURA 20: Antagonismo contra o fungo *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição na presença do endófito *Cladosporium* sp.

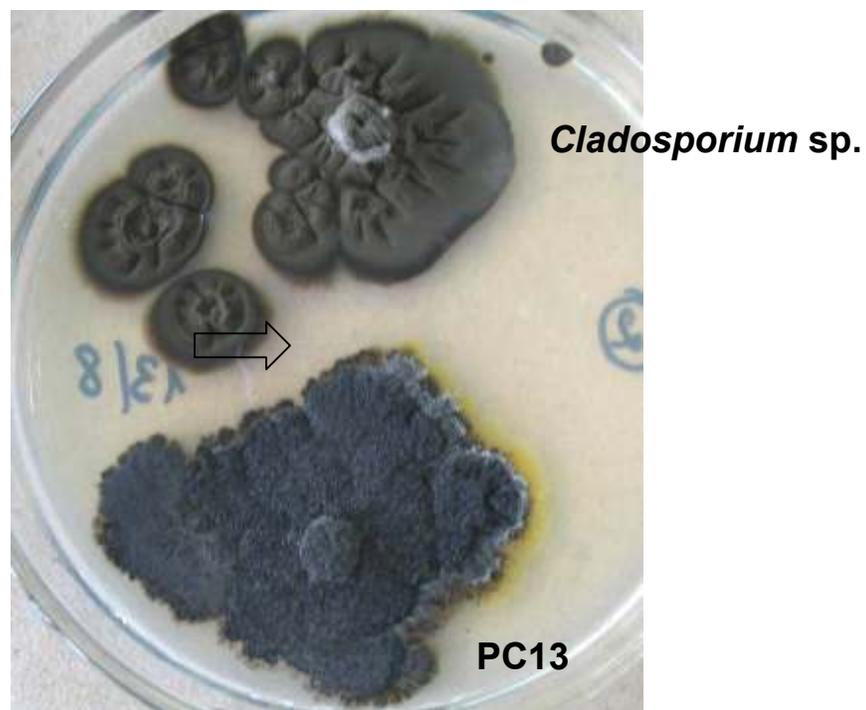
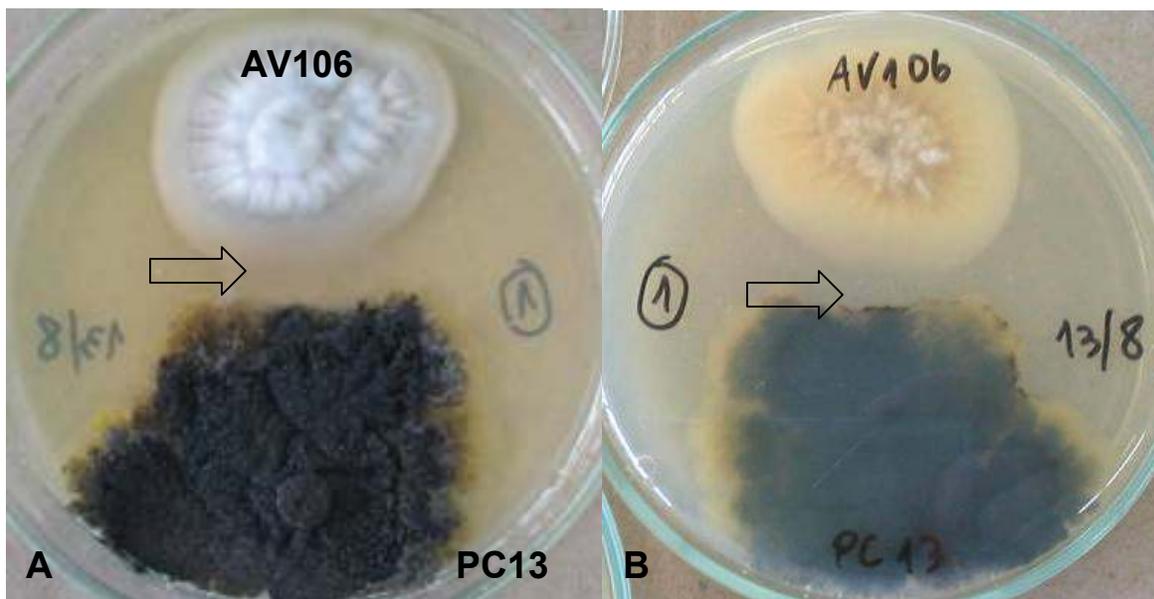


FIGURA 21: Antagonismo contra o fungo *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição na presença do endófito AV106, não identificado



Legenda: A – frente; B - verso da placa

FIGURA 22: Antagonismo contra o fungo *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição na presença de FD90, não identificado

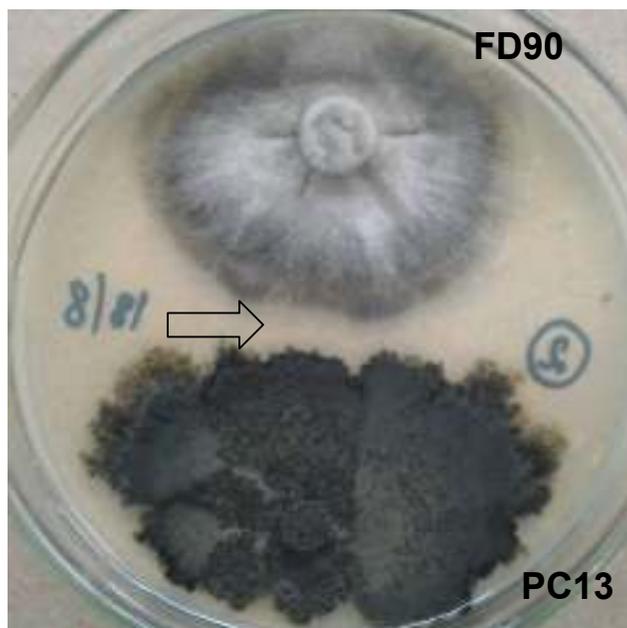
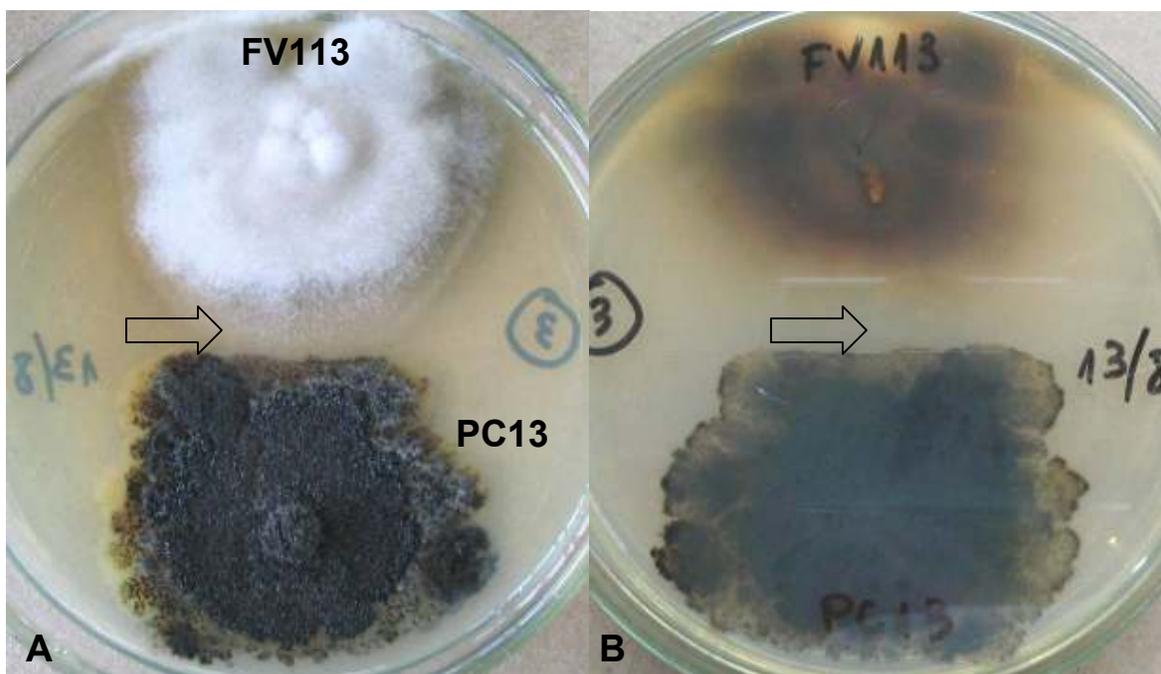
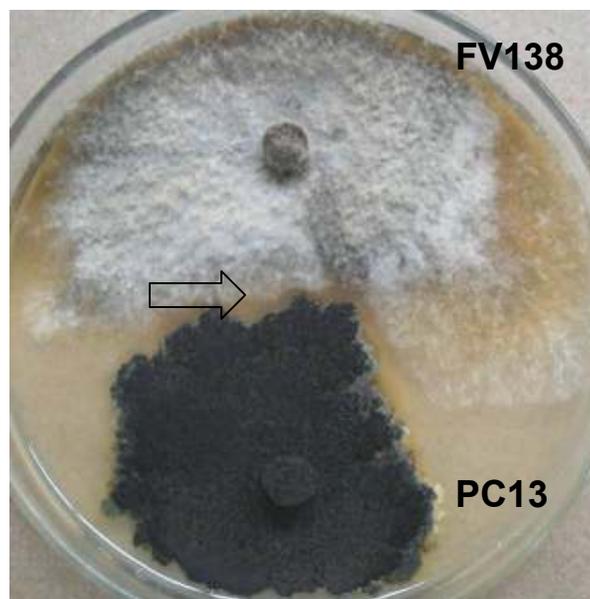


FIGURA 23: Antagonismo contra o fungo *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição do crescimento do patógeno na presença do endófito FV113, não identificado



Legenda: A – frente; B – verso da placa

FIGURA 24: Antagonismo contra o fungo *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta em Citros, linhagem PC13; inibição na presença de FV138, fungo não identificado.

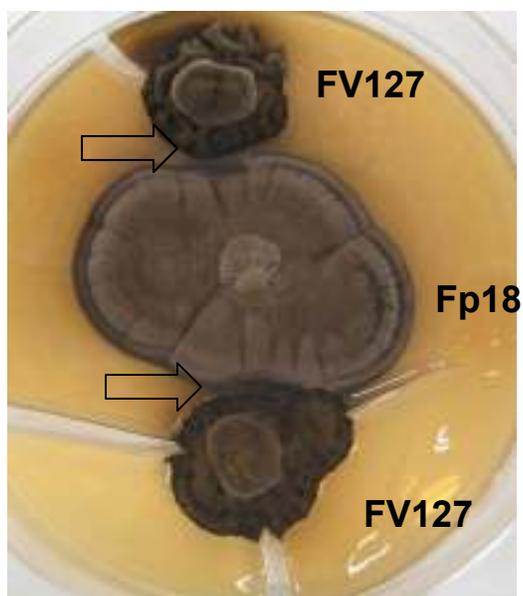


Apenas dois isolados fúngicos inibiram o patógeno *Fonsecaea pedrosoi* Fp18, o FD90 (Figura 25) e o FV127 (Figura 26), ambos não identificados.

FIGURA 25: Antagonismo contra o fungo *Fonsecaea pedrosoi*, linhagem Fp18, causadora da cromoblastomicose em humanos; inibição do crescimento do patógeno diante do endófito FD90, não identificado.



FIGURA 26: Antagonismo contra o fungo *Fonsecaea pedrosoi*, linhagem Fp18, causadora da cromoblastomicose em humanos; inibição frente ao endófito FV127, não identificado.



A fim de se investigar a possibilidade de produção de substâncias inibidoras voláteis pelos endófitos, foram testados alguns isolados que haviam formado halos de inibição contra patógenos nos ensaios de confronto direto em placa, utilizando o método de DICK e HUTCHINSON (1966), com algumas modificações. Ao invés das placas sobrepostas, foram usadas placas descartáveis com divisória, impedindo o contato direto entre os antagonistas e os patógenos. Foram ensaiados os fungos FV113 contra a linhagem I51-2 de *Fusarium* sp., e AV106, FD90 e FV113 contra a linhagem PC13 de *Guignardia citricarpa*.

As Figuras 27 a 29 ilustram os resultados dos testes de inibição por volatilidade. O endófito FV113 não foi capaz de inibir o crescimento de *Fusarium* sp., como mostra a Figura 27. Em alguns dias o patógeno ultrapassou a divisória da placa, porém não houve contato direto entre os dois fungos, formando-se halo de inibição por pareamento e não por volatilidade (Figura 28). Desta forma, não se pode sugerir que o endófito FV113 produz substâncias bioativas voláteis contra o patógeno de milho *Fusarium* sp. I51-2. Com relação à linhagem PC13 de *Guignardia citricarpa*, este endófito não foi capaz de inibir o crescimento, porém apresentou alteração na coloração de pigmento de verde para marrom na presença do patógeno (Figura 29). O fungo AV106 não inibiu PC13 nos testes de volatilidade. O mesmo ocorreu com relação a FD90, porém pode-se observar modificação na morfologia da colônia do endófito (Figura 30), fato que merece melhor investigação em trabalhos futuros, principalmente envolvendo alterações na taxa de esporulação destes fungos.

FIGURA 27: Teste de volatilidade de substâncias antimicrobianas entre os fungos FV113 e *Fusarium sp.* I51-2, mostrando inibição de crescimento do patógeno em relação ao controle sem o endófito apenas devido ao pareamento e não por substâncias voláteis.

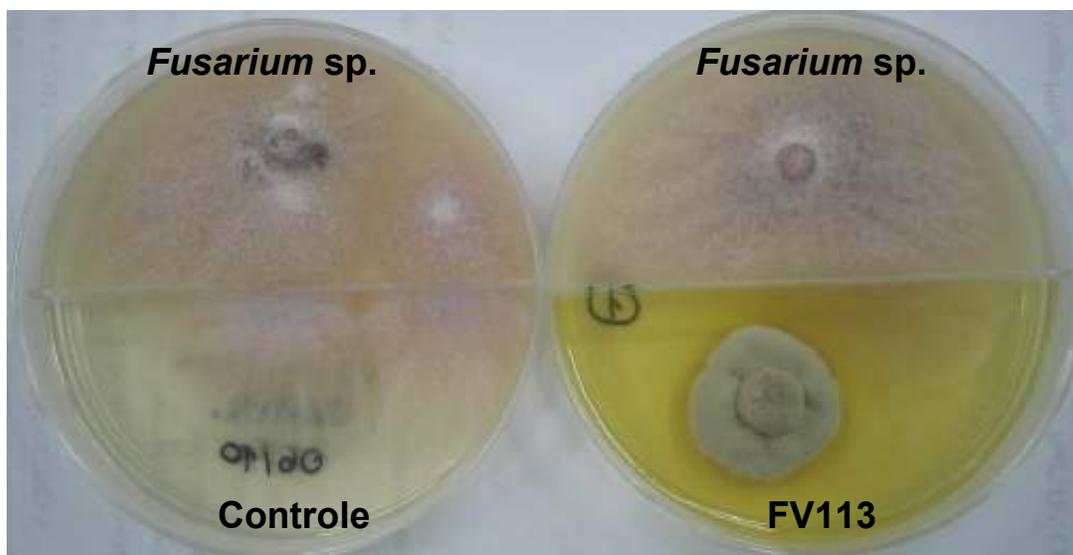


FIGURA 28: Teste de volatilidade de substâncias antimicrobianas entre os fungos FV113 e *Fusarium sp.* I51-2; nota-se o início da formação do halo de inibição de crescimento do patógeno em relação ao controle sem o endófito apenas devido ao pareamento e não por substâncias voláteis.

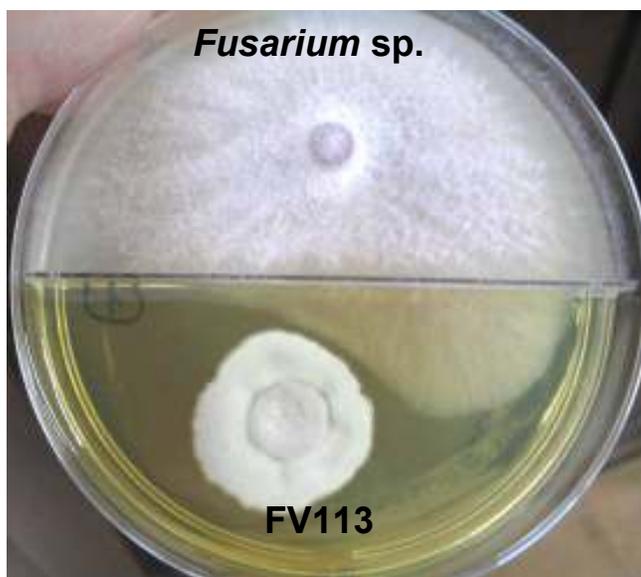


FIGURA 29: Teste de volatilidade de substâncias antimicrobianas entre os fungos FV113 e *Guignardia citricarpa* PC13, observando-se mudanças na coloração do pigmento produzido pelo endófito.

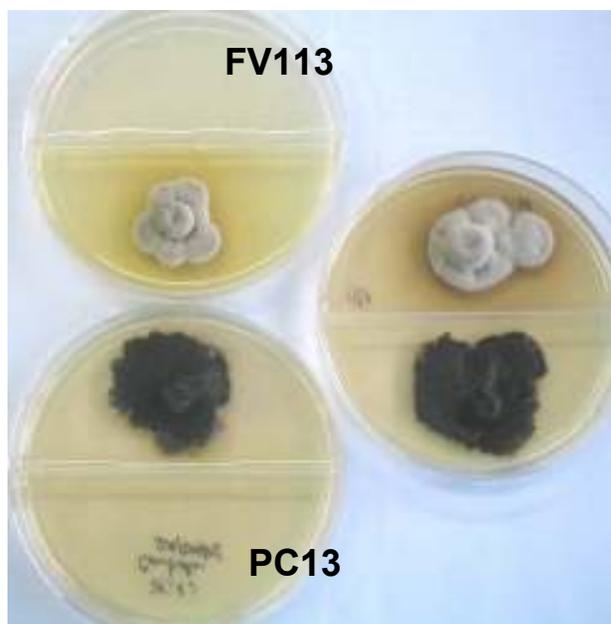
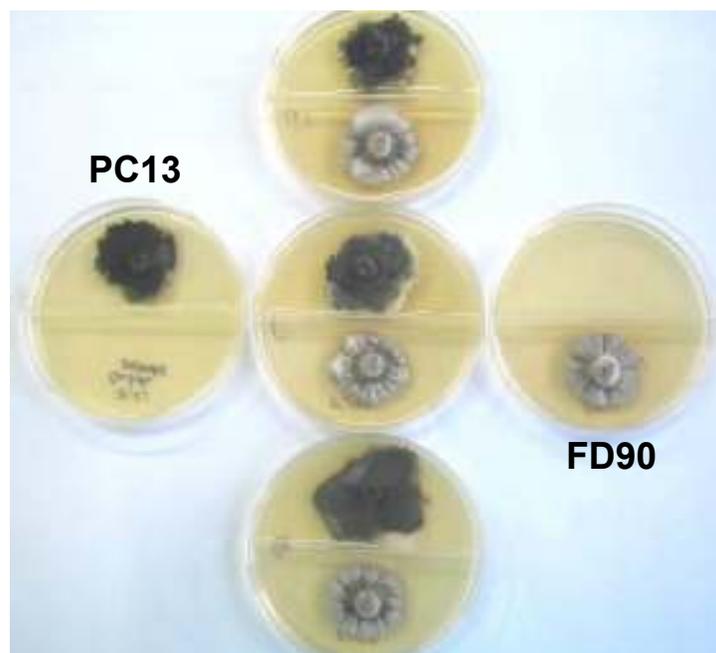


FIGURA 30: Teste de volatilidade de substâncias antimicrobianas entre os fungos FD90 e *Guignardia citricarpa* PC13, observando-se alterações na morfologia da colônia.



4.2.2. Atividade antibacteriana em meio sólido

Foram testadas as bactérias endofíticas isoladas de sementes de espinheira-santa contra as bactérias patogênicas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Tabela 4).

Com relação à atividade antibacteriana dos fungos endofíticos contra as linhagens referência, o isolado AD99, identificado como *Alternaria* sp. (Figura 31), e o isolado FV113 (Figura 32), produziram halos de inibição contra *Micrococcus luteus* ATCC 9341. ARAÚJO, SILVA e AZEVEDO (2000) também verificaram inibição de *M. luteus*, bem como de *Staphylococcus aureus*, por actinomicetos endofíticos de folhas e raízes de milho.

FIGURA 31: Halo de inibição produzido por *Alternaria* sp. (AD99), na presença de *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

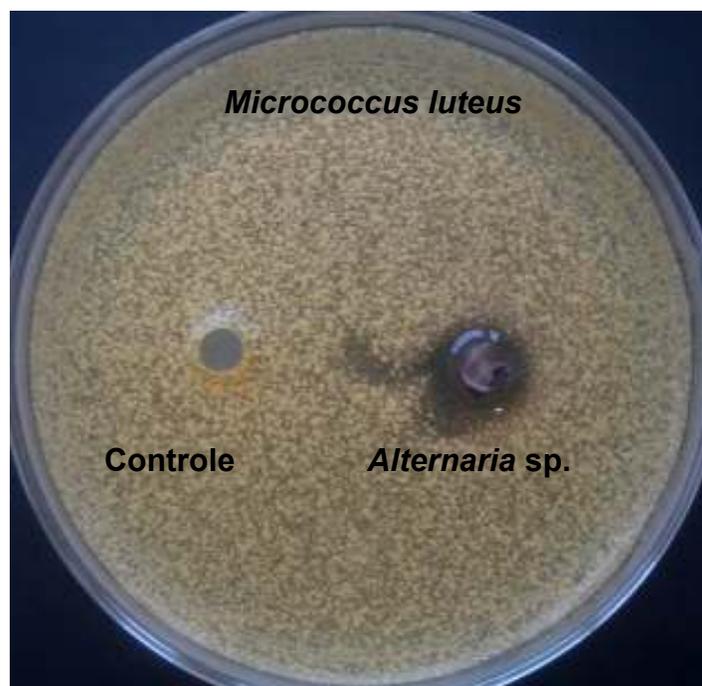


FIGURA 32: Halo de inibição produzido pelo isolado FV113 na presença de *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

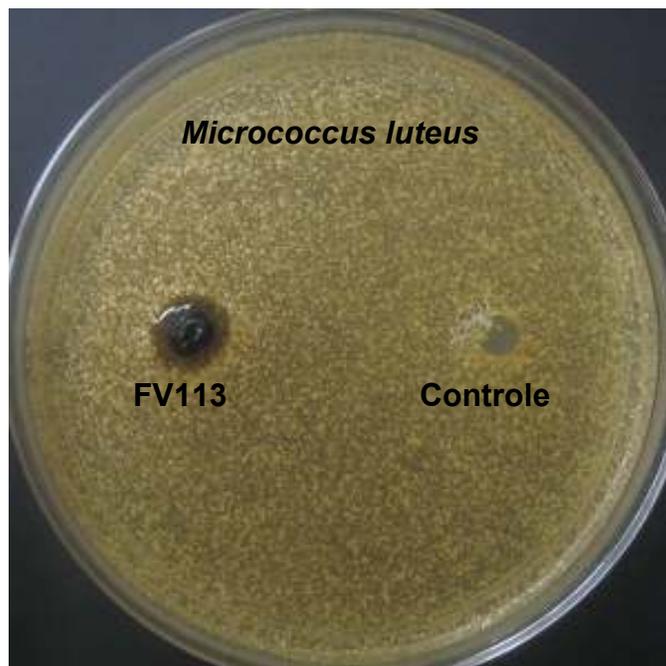
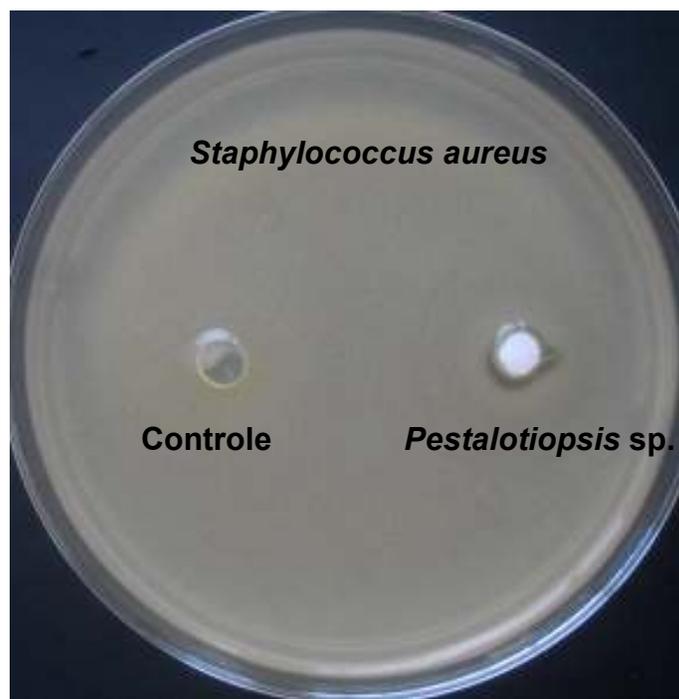


FIGURA 33: Halo de inibição produzido por *Pestalotiopsis* sp. (SD07), na presença de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.



O endófito SD07, identificado como *Pestalotiopsis* sp. (Figura 33), inibiu *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Esta bactéria também foi inibida por extratos do fungo endofítico *Guignardia* sp., isolado da planta medicinal *Spondias mombin* (RODRIGUES; HESSE; WERNER, 2000). Metabólitos ativos de *Colletotrichum* sp., isolados endofiticamente da planta medicinal *Artemisia annua*, também mostraram inibição frente a *S. aureus* (LU et al., 2000). O mesmo fungo, isolado como endófito de *Artemisia mongolica*, apresentou atividade contra *S. aureus* (ZOU et al., 2000). CASTILLO et al. (2002) isolaram a substância munumbicina B, produzida por *Streptomyces* sp., endofítico de *Kennedia nigriscans*, que mostrou ação contra *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). Em 2004, CORRADO e RODRIGUES testaram extratos de *Phomopsis* sp., endófitos das plantas *Spondias mombin* e *Aspidosperma tomentosum*, três dos quais inibiram crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

Os 15 endófitos que promoveram a formação de halo contra algum patógeno ensaiado, estão listados na Tabela 8. Os demais 94 isolados não apresentaram atividade contra nenhum dos patógenos testados.

Além destes 15 endófitos, outros 22, apesar de não promoverem a formação de halo de inibição, apresentaram um potencial para controle biológico dos patógenos ensaiados, em especial às linhagens de *Guignardia citricarpa* PC13 e PC3C, conforme mostram a Tabela 9 e as Figuras 34 a 43. Tais isolados causaram inibição de crescimento por incompatibilidade vegetativa ou cresceram sobrepondo-se ao micélio do patógeno, justificando estudos mais aprofundados em nível citológico, por meio de pareamento em lâminas de microcultivo, podendo-se inferir sobre o tipo de interação que ocorre entre as hifas de ambos os fungos, bem como investigações sobre alterações na esporulação dos patógenos.

TABELA 8: Resultados dos testes de antagonismo de 15 endófitos isolados de espinheira-santa contra 6 patógenos ensaiados, que formaram halos de inibição

Grupos	Endófitos	Patógenos ensaiados					
		<i>Fusarium</i> sp. I51-2	<i>Trichoderma</i> sp. CNBP ₂ F ₁₆	<i>Fonsecae</i> <i>pedrosoi</i> Fp18	<i>Guignardia</i> <i>citricarpa</i> PC13	<i>Micrococcus</i> <i>luteus</i> ATCC 9341	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 29213
<i>Alternaria</i> sp.	AD99	-	-	-	-	+	-
<i>Bipolaris</i> sp.	FV123	-	+	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	AV165	-	-	-	+	-	-
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	SD07	-	-	-	-	-	+
I	SV05	-	+	-	-	-	-
III	FV127	-	-	+	-	-	-
IV	FV138	-	-	-	+	-	-
V	FD90	-	-	+	+	-	-
VI	AV106	-	-	-	+	-	-
VI	SD26	-	+	-	-	-	-
XII	FV113	+	-	-	+	+	-
XIII	FAC32	+	-	-	-	-	-
Morfotipo 2	S4	+	-	-	-	-	-
Morfotipo 2	S24	+	-	-	-	-	-
Morfotipo 6	S1	+	-	-	-	-	-

Legenda: (+) halo de inibição presente; (-) halo de inibição ausente

TABELA 9: Resultados dos testes de antagonismo de 22 endófitos isolados de espinheira-santa contra 6 patógenos ensaiados, que apresentaram potencial para controle biológico

Grupos	Endófitos	Patógenos ensaiados					
		<i>Fusarium</i> sp. I51-2	<i>Trichoderma</i> sp. CNBP ₂ F ₁₆	<i>Guignardia</i> <i>citricarpa</i> PC3C	<i>Guignardia</i> <i>citricarpa</i> PC13	<i>Fonsecaea</i> <i>pedrosoi</i> Fp18	<i>Candida</i> <i>albicans</i>
<i>Alternaria</i> sp.	AD99	-	-	-	+	-	-
<i>Alternaria</i> sp.	FV06	-	-	-	+	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	COL13	-	-	-	-	+	+
<i>Colletotrichum</i> sp.	COL10	-	-	-	+	-	-
I	AV70	-	+	+	+	-	+
I	FD76	-	-	-	-	-	+
I	FD86	-	-	-	-	+	+
I	FV28	-	-	+	+	-	-
I	FV136	-	-	-	+	-	-
I	FV143	-	+	-	-	-	+
I	SD01	-	-	+	-	-	-
I	SD07	+	-	-	+	-	-
I	SV03	+	-	+	+	+	+
I	SV05	-	-	-	-	-	+
I	SV12	+	-	-	-	-	-
III	FV92	-	-	-	+	-	-
IV	FD75	-	-	+	-	-	+
IV	FV32	+	-	+	-	-	-
IV	FV112	-	-	-	-	-	+
IV	FV138	-	-	-	-	-	+
VI	SD26	-	-	-	-	+	-
XIII	FAC32	+	-	-	-	-	-

Os isolados AV70, SV03 e FV28 apresentaram potencial para controle de ambas as linhagens de *G. citricarpa* (PC13 e PC3C) testadas. Tais linhagens foram isoladas como endófitos, porém eventualmente podem tornar-se patogênicas, causando a mancha preta em frutos de *Citrus*. A linhagem PC3C apresenta resistência a altas concentrações do fungicida benomyl (POSSIEDE, 2004), o que dificultaria o seu controle químico caso manifestasse lesões nos frutos. Por esta razão, estudos futuros envolvendo o controle biológico deste potencial fitopatogênico se mostram necessários e merecedores de investigações mais detalhadas.

FIGURA 34: Pareamento frente ao fungo patogênico de milho *Fusarium* sp., linhagem I51-2, mostrando o potencial dos isolados FV32 (A) e SV03 (B) para controle biológico.

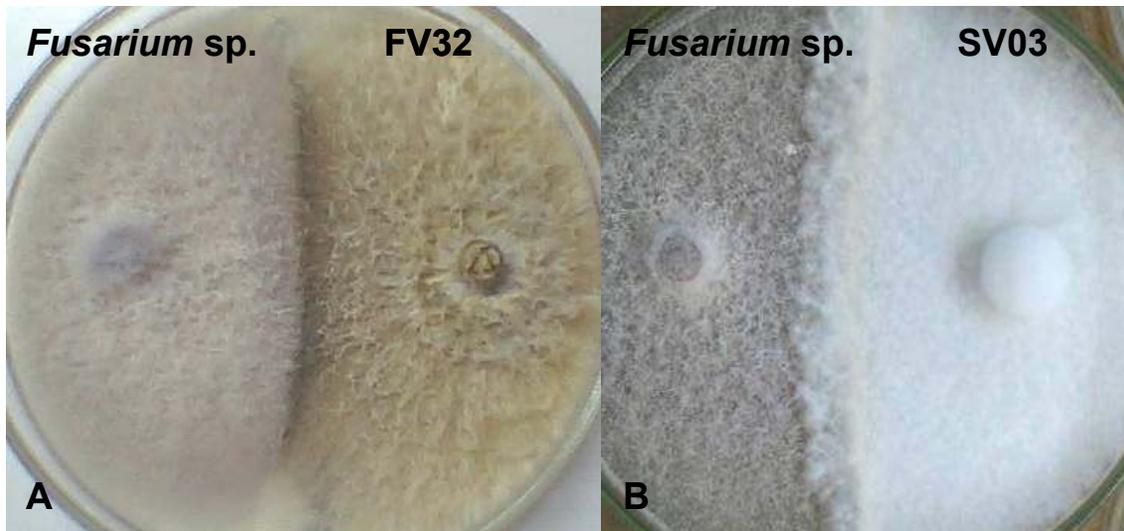


FIGURA 35: Pareamento frente ao fungo patogênico de café *Trichoderma* sp., linhagem CNBP₂F₁₆, mostrando o potencial dos isolados FV28 (A) e FV143 (B) para controle biológico.

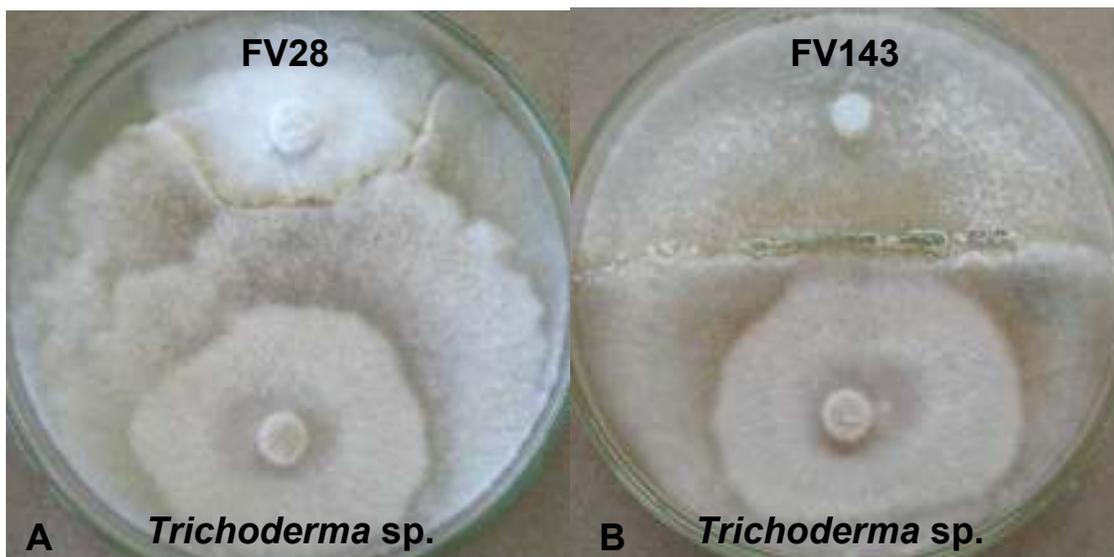


FIGURA 36: Pareamento frente ao fungo patogênico de *Citrus*, *Guignardia citricarpa*, linhagem PC3C, mostrando o potencial dos isolados AV70 (A) e FD75 (B) para controle biológico.

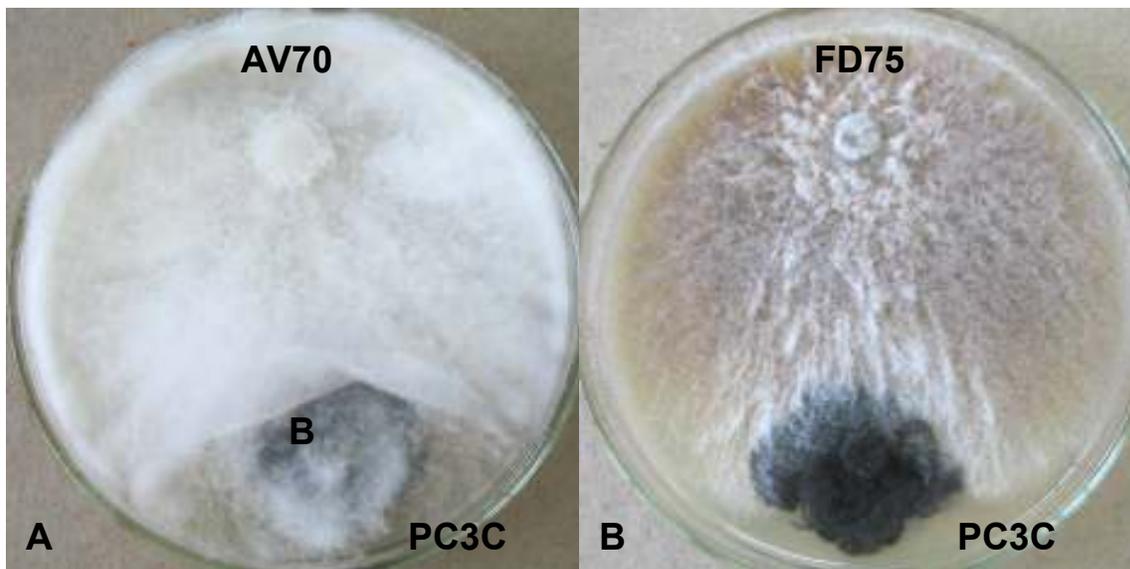


FIGURA 37: Pareamento frente ao fungo patogênico de *Citrus*, *Guignardia citricarpa*, linhagem PC3C, mostrando o potencial dos isolados FV28 (A) e SD01 (B) para controle biológico.

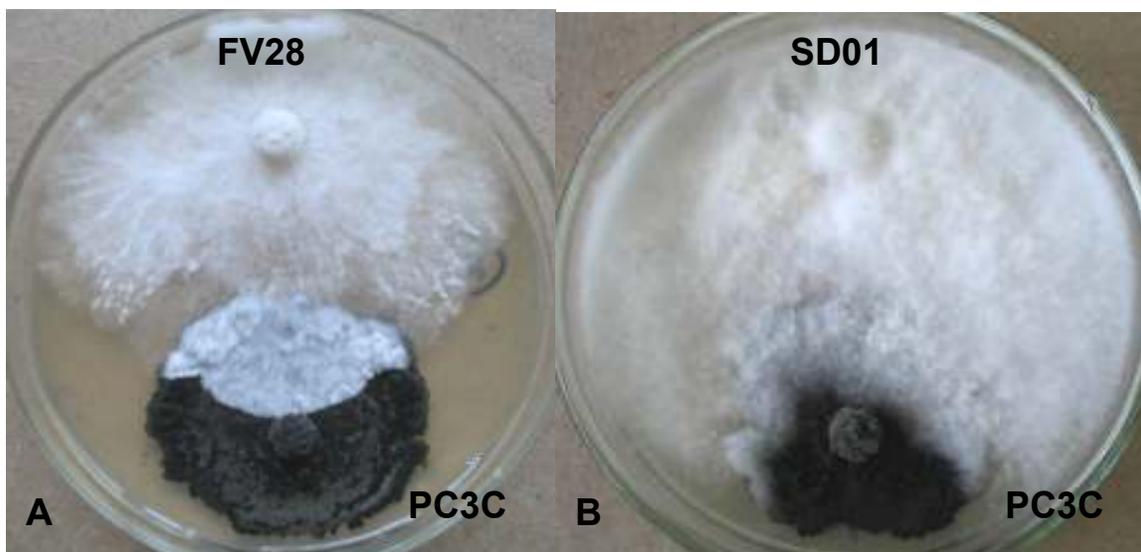


FIGURA 38: Pareamento frente ao fungo patogênico de *Citrus*, *Guignardia citricarpa*, linhagem PC13, mostrando o potencial do isolado FV28 para controle biológico; em (A) pareamento após 7 dias e em (B) após 14 dias.

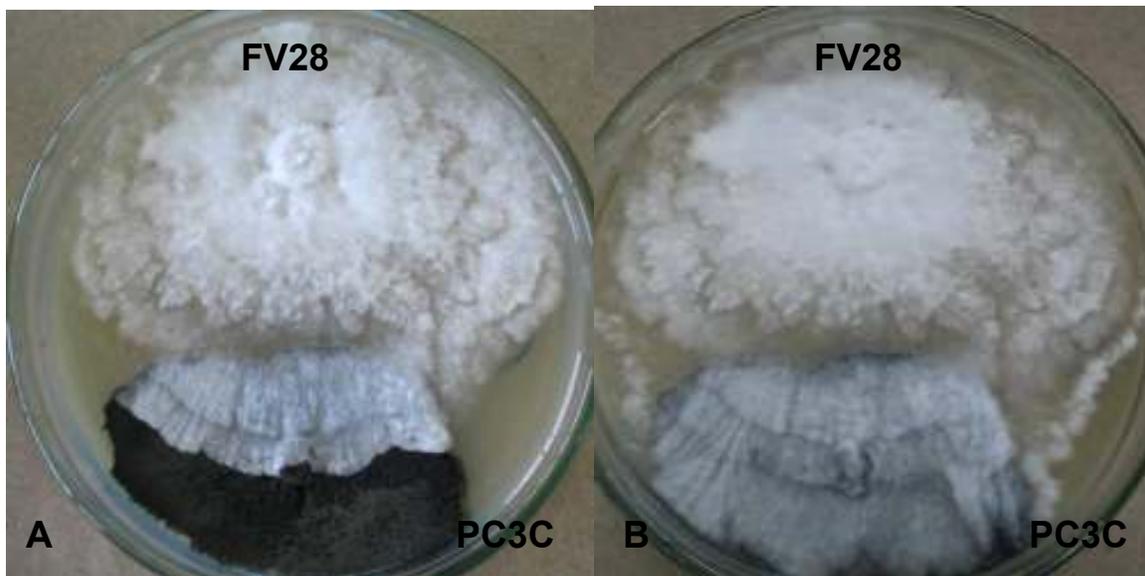


FIGURA 39: Pareamento frente ao fungo patogênico de *Citrus*, *Guignardia citricarpa*, linhagem PC13, mostrando o potencial do isolado AV70 para controle biológico; em (A) verso das placas com pareamento após 14 dias e em (B) frente.

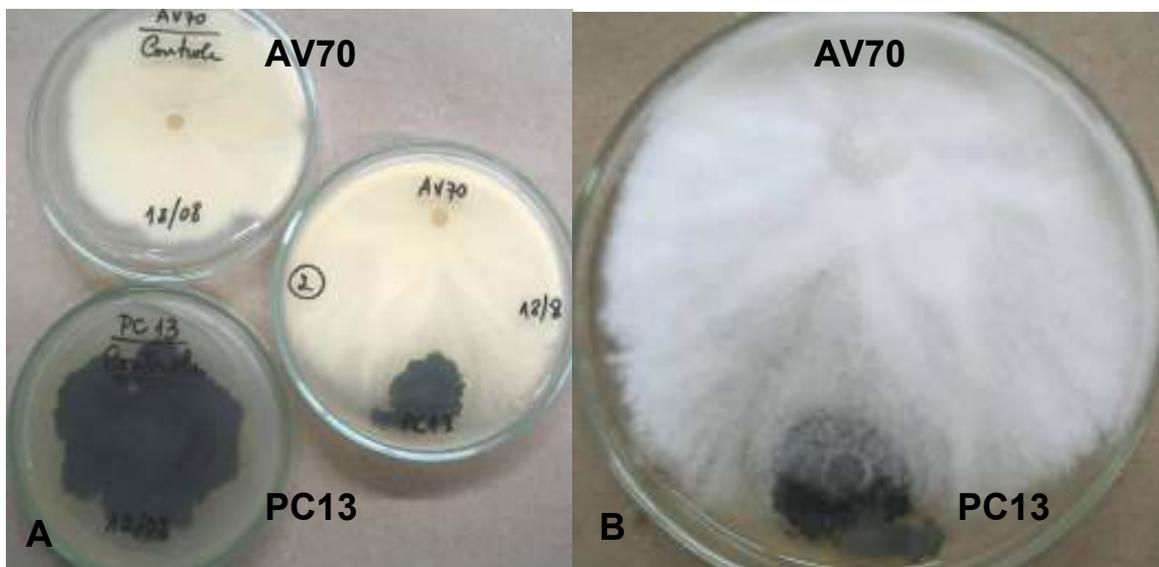


FIGURA 40: Pareamento frente ao fungo patogênico de *Citrus*, *Guignardia citricarpa*, linhagem PC13, mostrando o potencial dos isolados FV136 (A) e COL10 (B) para controle biológico.

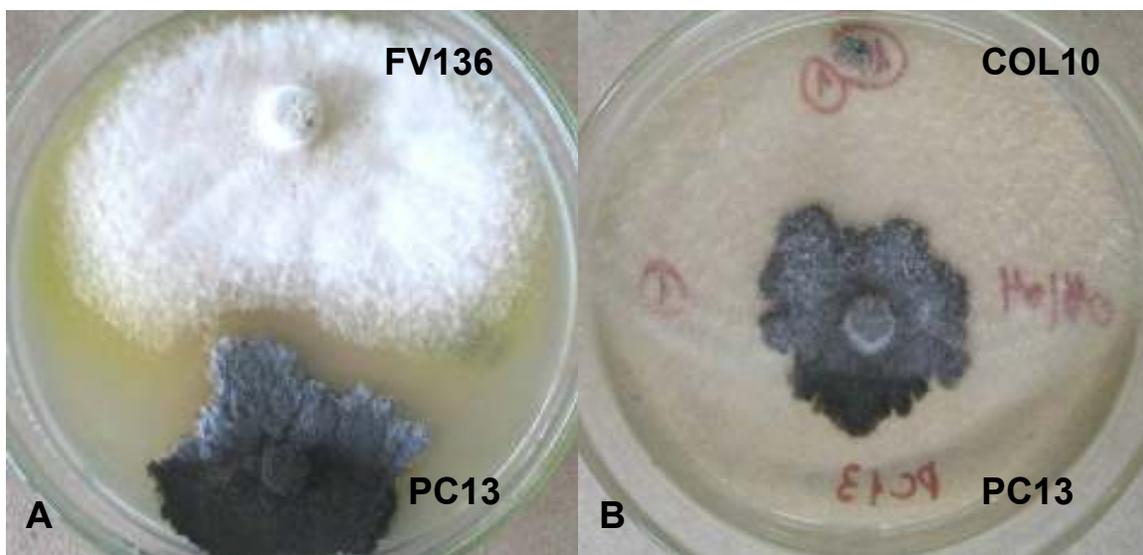


FIGURA 41: Pareamento frente à levedura *Candida albicans* ATCC 10231, mostrando o potencial biotecnológico dos isolados FV112 (A) e SV03 (B).

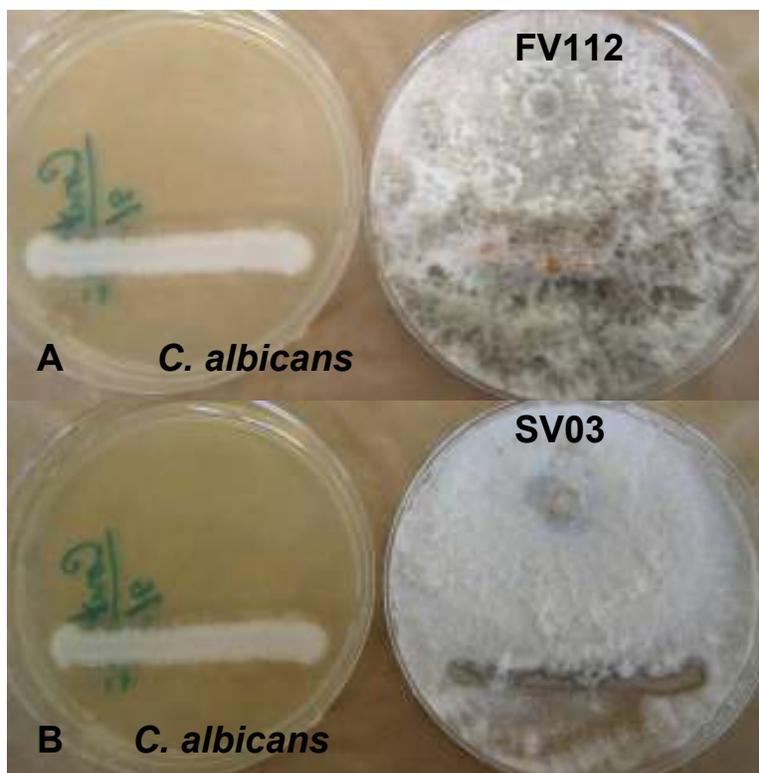


FIGURA 42: Pareamento frente ao fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi*, linhagem Fp18, mostrando o potencial biotecnológico dos isolados COL13 (A) e SV03 (B).

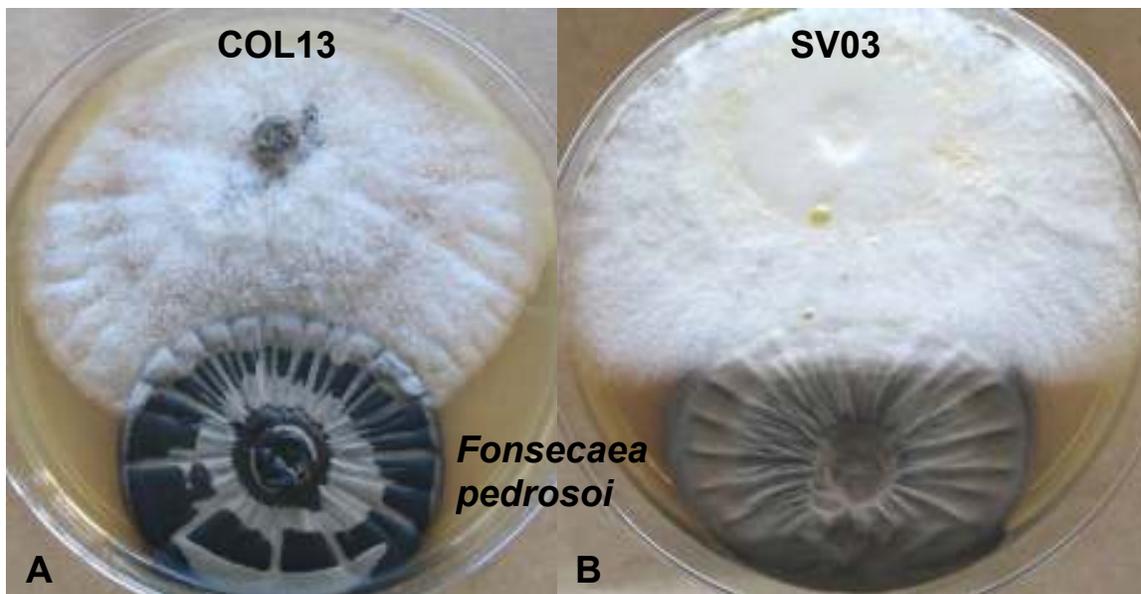
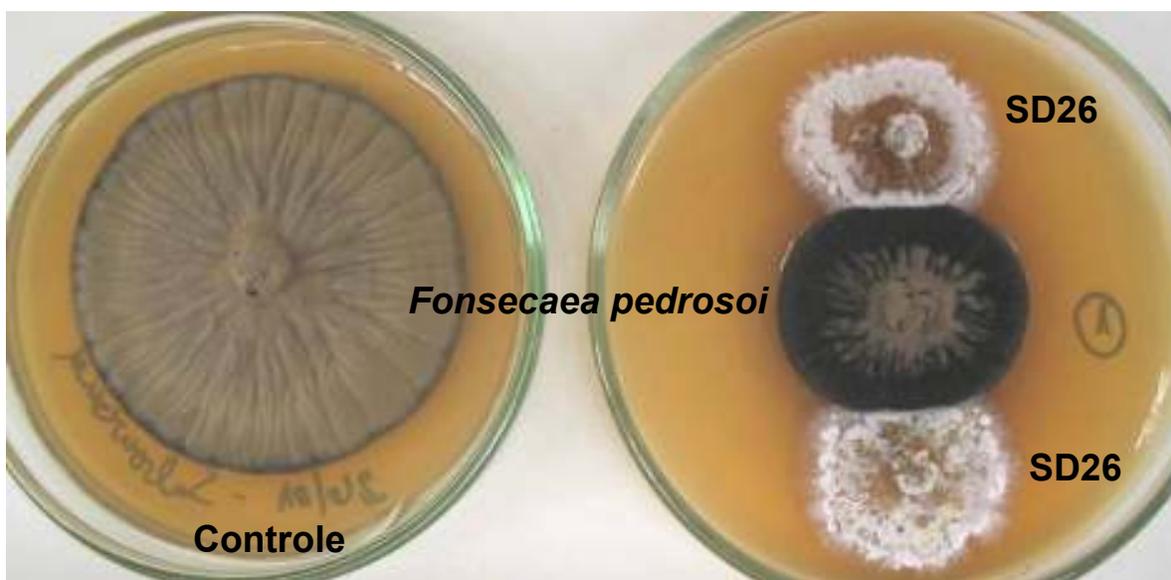


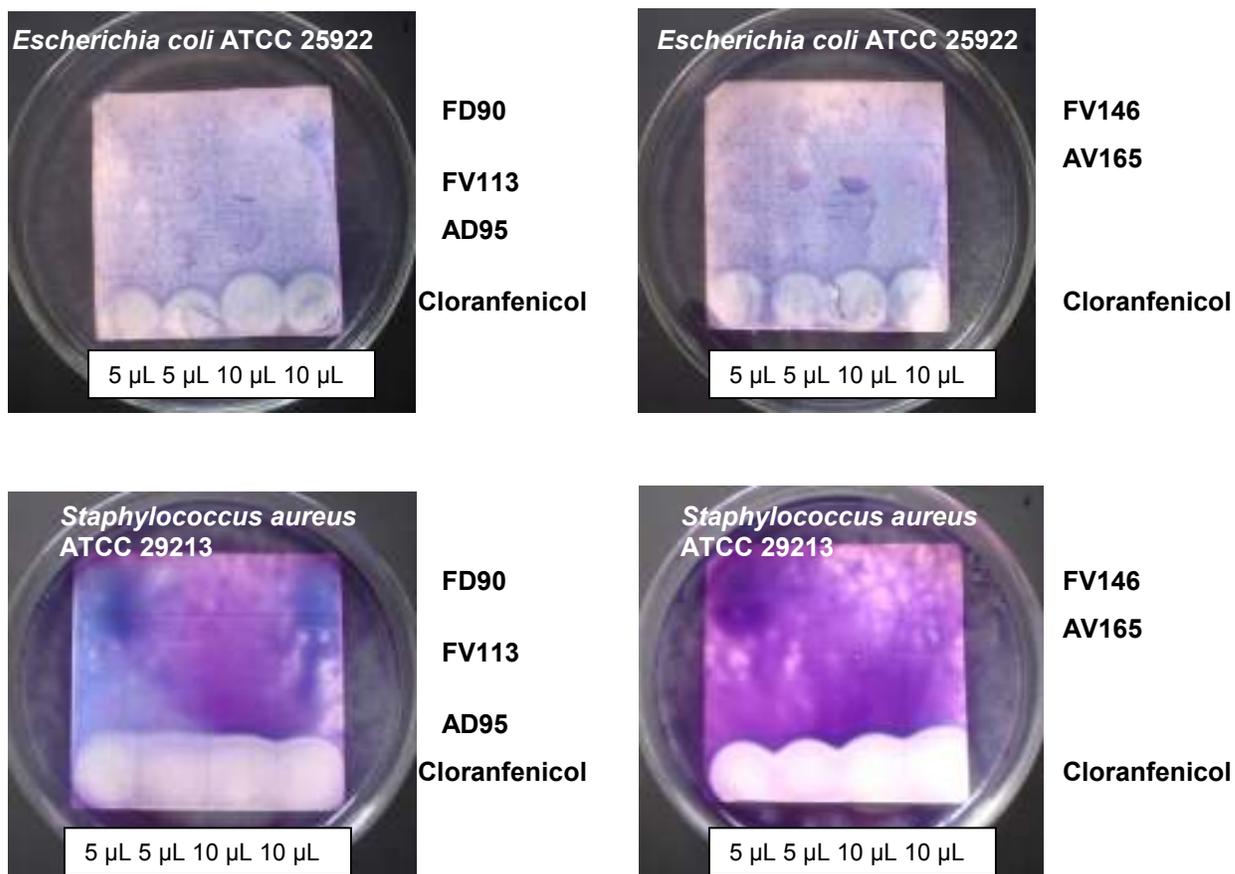
FIGURA 43: Pareamento frente ao fungo patogênico humano *Fonsecaea pedrosoi*, linhagem Fp18, mostrando alterações na morfologia da colônia provocadas pela presença do isolado SD26, comparando-se com o controle sem o endofítico.



4.2.3. Bioautografia em cromatografia de camada delgada (CCD) pelo método *agar-overlay*

Foram obtidos cinco extratos brutos dos fungos selecionados: AD95, AV165, FD90, FV113, FV127 e FV146. O acetato de etila foi o solvente utilizado para a obtenção dos extratos, e o metanol foi usado para ressuspender os mesmos numa concentração de 10 mg/mL. Nas primeiras duas colunas verticais das placas de sílica foram aplicados 5 μ L da solução do extrato a 10 mg/mL, e nas duas últimas colunas 10 μ L. Nas três primeiras linhas horizontais foram aplicados os extratos e na quarta linha o controle positivo, uma solução de cloranfenicol na concentração de 20 μ g/mL. A bioautografia em CCD foi ensaiada contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

FIGURA 44: Bioautografia em cromatografia de CCD pelo método *agar overlay*



Como mostra a Figura 44, não foram constatados halos de inibição produzidos pelos extratos avaliados, nos ensaios com as linhagens referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, apenas pelo controle positivo, o cloranfenicol, como esperado. Em experimentos futuros, estes e outros extratos deverão ser testados frente às demais linhagens referência.

4.4. Caracterização morfológica e molecular de isolados endofíticos de *Colletotrichum* spp.

Neste estudo, não foi constatada atividade antagonista ou antimicrobiana de *Colletotrichum* frente às linhagens referência ensaiadas, no entanto, este grupo foi selecionado para caracterização molecular por RAPD, por diversas razões. Primeiramente, trata-se de um fungo de fácil cultivo e rápida identificação morfológica em nível macro e microscópico. Em segundo lugar, tem sido freqüentemente isolado como endófito em diversas plantas hospedeiras, muitas vezes destacando-se como gênero dominante. Neste trabalho, foi o quarto grupo de fungos isolados com maior freqüência, em número suficiente para o estudo de sua caracterização molecular por RAPD. Trata-se de um fungo isolado como endofítico em espinheira-santa, contudo é descrito como um importante patógeno em outras culturas. Na literatura, vários endófitos deste gênero têm sido descritos como potenciais produtores de substâncias antimicrobianas, como é o caso do ácido coletótrico (ZOU et al., 2000; LU et al., 2000). E finalmente, é possível que os resultados negativos obtidos neste trabalho sejam devidos à metodologia empregada ou à escolha das linhagens referência, o que não descarta a possibilidade dos mesmos serem produtores de compostos bioativos.

A Figura 45 mostra o aspecto macroscópico das colônias monospóricas de *Colletotrichum* sp., crescidas em meio de cultura BDA, pH 6,8, a 28°C, por 14 dias. As Figuras 46 a 50 ilustram as estruturas de reprodução destes fungos, observadas em lâminas de microcultivo.

FIGURA 45: Aspecto macroscópico das colônias monospóricas de *Colletotrichum* sp., endófitos de folhas de espinheira-santa, utilizadas para o estudo da variabilidade genética por meio de RAPD.

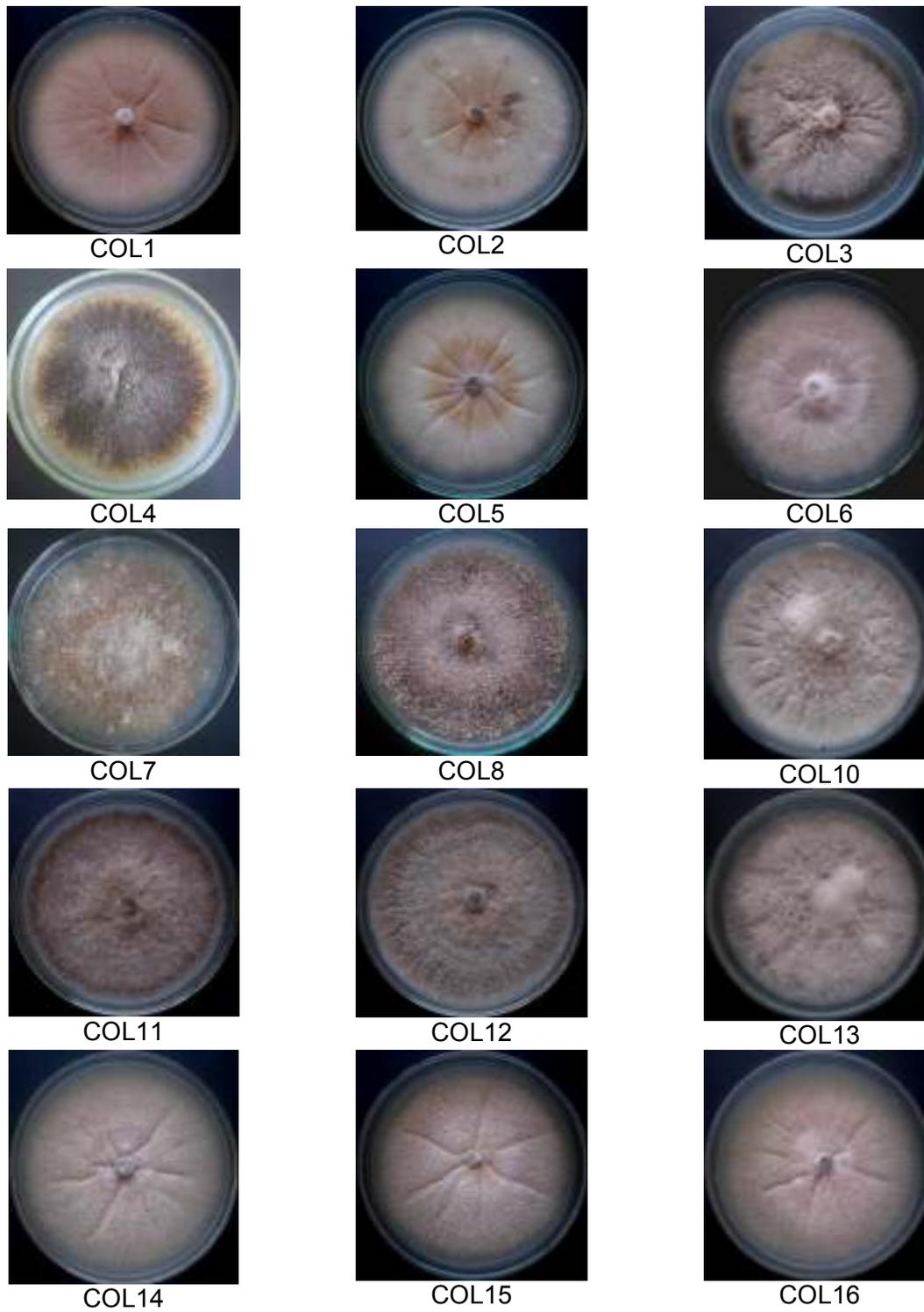


FIGURA 46: Fotomicrografia de esclerócio da linhagem COL7 e a presença de conídios e seta (400X)

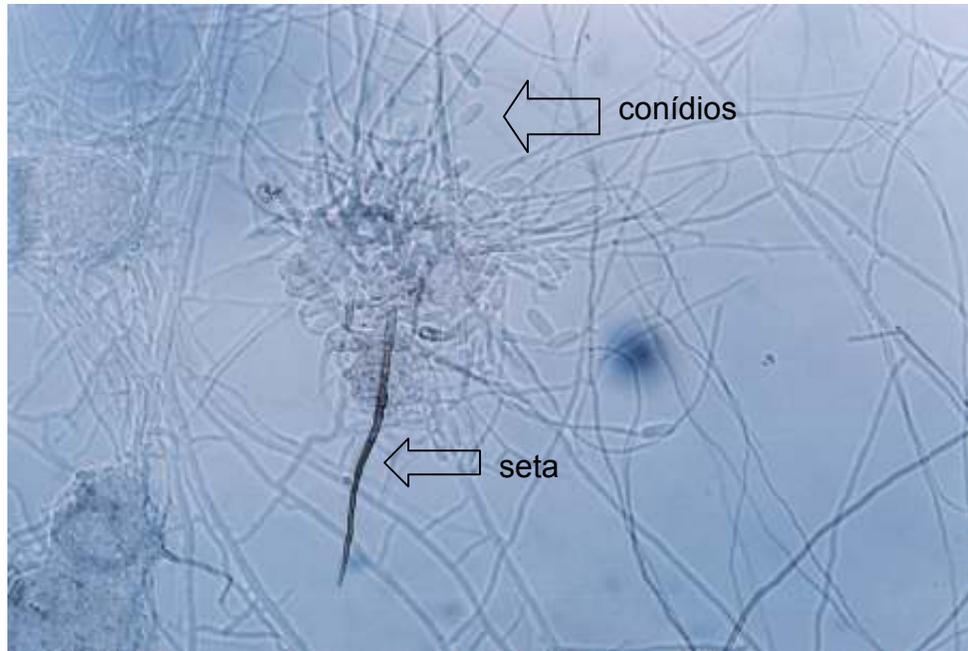


FIGURA 47: Fotomicrografia de apressórios e conídios da linhagem COL8 (400X)



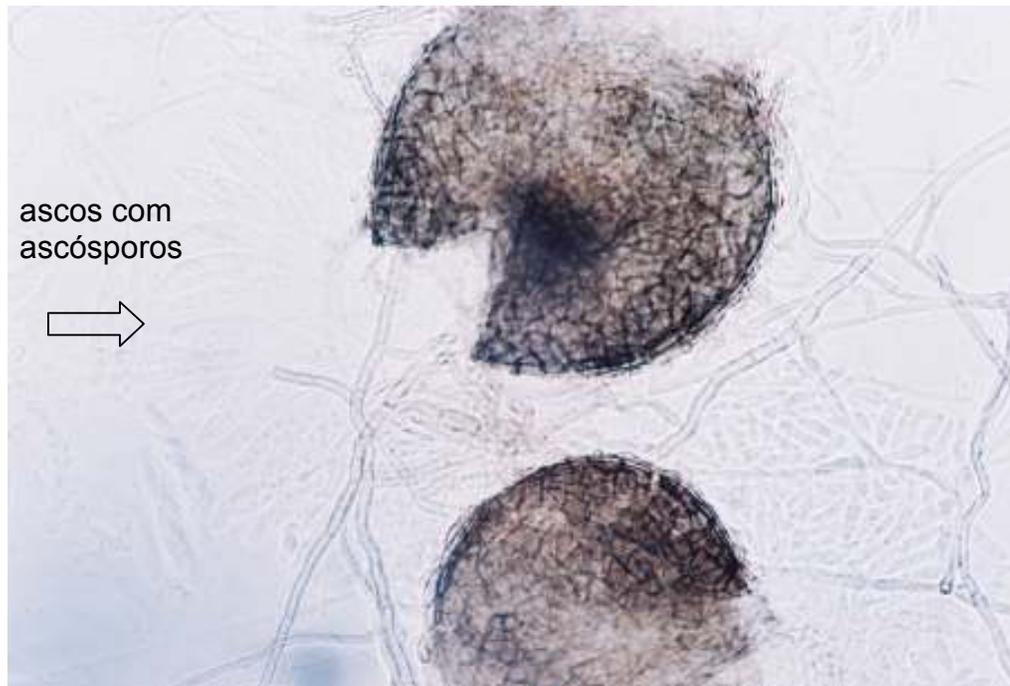
FIGURA 48: Fotomicrografia de esclerócio da linhagem COL3 e a presença de conídios e setas(100X)



FIGURA 49: Fotomicrografia de apressórios e conídios da linhagem COL2 (400X)



FIGURA 50: Fotomicrografia de ascos com ascósporos da linhagem COL1 (400X)



A Tabela 10 relaciona as medidas em micrômetros dos conídios e a presença de ascos e ascósporos nas linhagens de *Colletotrichum* sp. De acordo com MUNAUT, HAMAIDE e MARAITE (2002), o tamanho dos conídios de *G. cingulata* foi em média 4-5,5 x 12,5-14 micrometros, valor semelhante ao encontrado neste trabalho.

Para os ensaios da caracterização molecular das linhagens de *Colletotrichum* sp. por meio de RAPD, foram selecionados doze *primers* (Operon Technologies®), os quais originaram bandas em maior quantidade e de melhor qualidade nas reações de PCR. A Tabela 11 apresenta os dez *primers* selecionados e suas respectivas seqüências de nucleotídios.

TABELA 10: Identificação dos isolados de *Colletotrichum* sp. baseada nas análises moleculares de RAPD e ITS¹, medidas do tamanho dos conídios e presença de ascos e ascósporos em lâminas de microcultivo

Isolados	Grupo no RAPD	Tamanho de conídios em µm	Presença de ascos e ascósporos	Seqüenciamento de regiões ITS ¹
COL1	Ia	5,0 x 13,6	+	<i>Glomerella</i> sp.
COL2	Ia	5,0 x 12,8	+	<i>Glomerella</i> sp.
COL3	Ib	5,1 x 11,3		<i>Colletotrichum</i> sp.
COL4	Ib	5,0 x 12,8	+	<i>Glomerella</i> sp.
COL5	Ib	NC		<i>Colletotrichum</i> sp.
COL6	Ib	5,0 x 12,1		<i>Colletotrichum boninense</i>
COL7	Ib	5,0 x 12,1		<i>Colletotrichum</i> sp.
COL8	Ib	5,0 x 12,4		<i>Colletotrichum</i> sp.
COL9	Ib	NC		<i>Colletotrichum</i> sp.
COL10	II	4,9 x 12,1		<i>Colletotrichum</i> sp.
COL11	II	4,9 x 12,7		<i>Colletotrichum</i> sp.
COL12	II	4,8 x 11,5		<i>Colletotrichum</i> sp.
COL13	II	4,9 x 12,4	+	<i>Glomerella cingulata</i>
COL14	Ic	NC	+	<i>Glomerella</i> sp.
COL15	Ic	NC	+	<i>Glomerella</i> sp.
COL16	Ic	7,3 x 11,9		<i>Colletotrichum</i> sp.

Legenda: NC – não caracterizado

¹Comunicação pessoal de VICENTE, V. A. (2006)

TABELA 11: *Primers* selecionados e suas respectivas seqüências de nucleotídios

<i>Primers</i> (Operon Technologies®)	Seqüência de nucleotídios
OPB-01	5' GTTTCGCTCC 3'
OPB-08	5' GTCCACACGG 3'
OPC-04	5' CCGCATCTAC 3'
OPE-08	5' TCACCACGGT 3'
OPQ-04	5' AGTGCGCTGA 3'
OPX-08	5' CAGGGGTGGA 3'
OPX-13	5' ACGGGAGCAA 3'
OPX-17	5' GACACGGACC 3'
OPZ-19	5' GTGCGAGCAA 3'

Houve amplificação de 188 bandas polimórficas, algumas delas ilustradas nas Figuras 51 a 55. A análise destes marcadores RAPD pelo *software* NTSYS (coeficiente Jaccard) com o agrupamento pelo método UPGMA permitiu a construção de um dendrograma de similaridade genética, representado na Figura 56.

FIGURA 51: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de *Colletotrichum* sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o *primer* OPB-08.

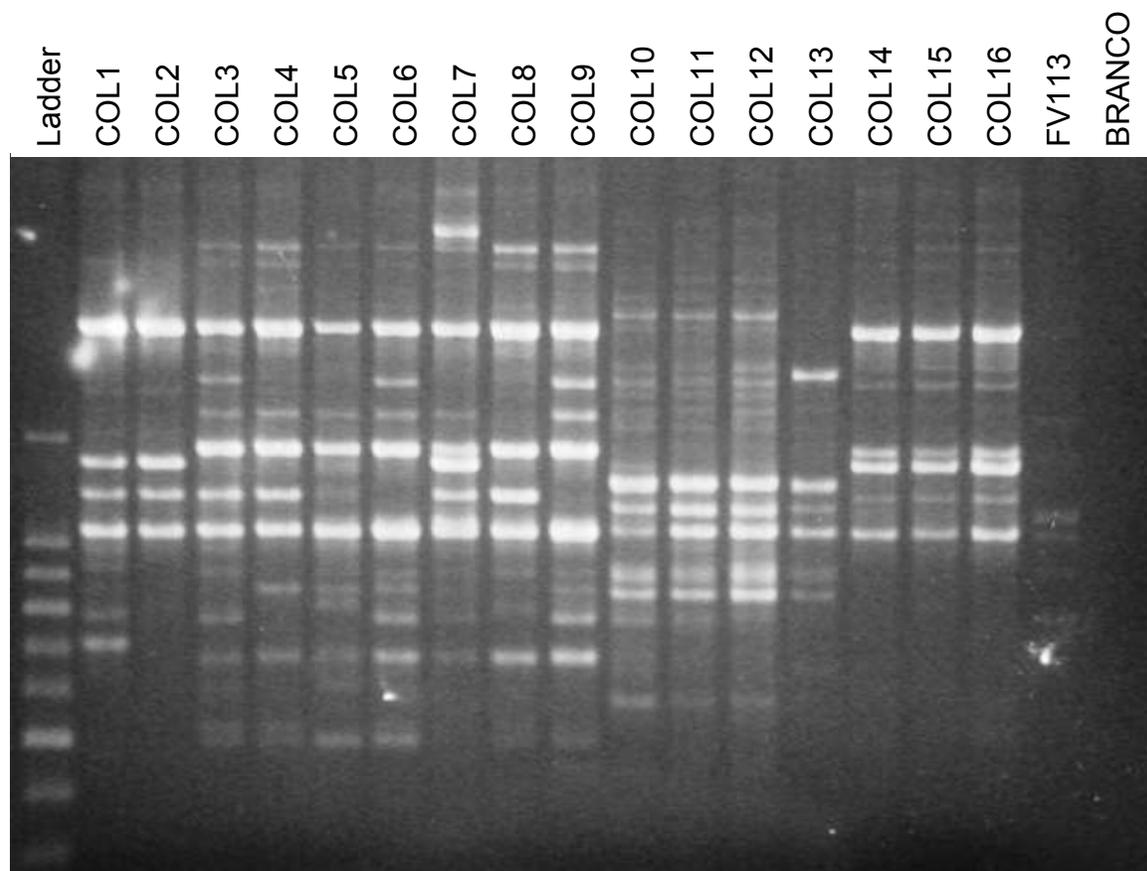


FIGURA 52: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de *Colletotrichum* sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o *primer* OPQ-04.

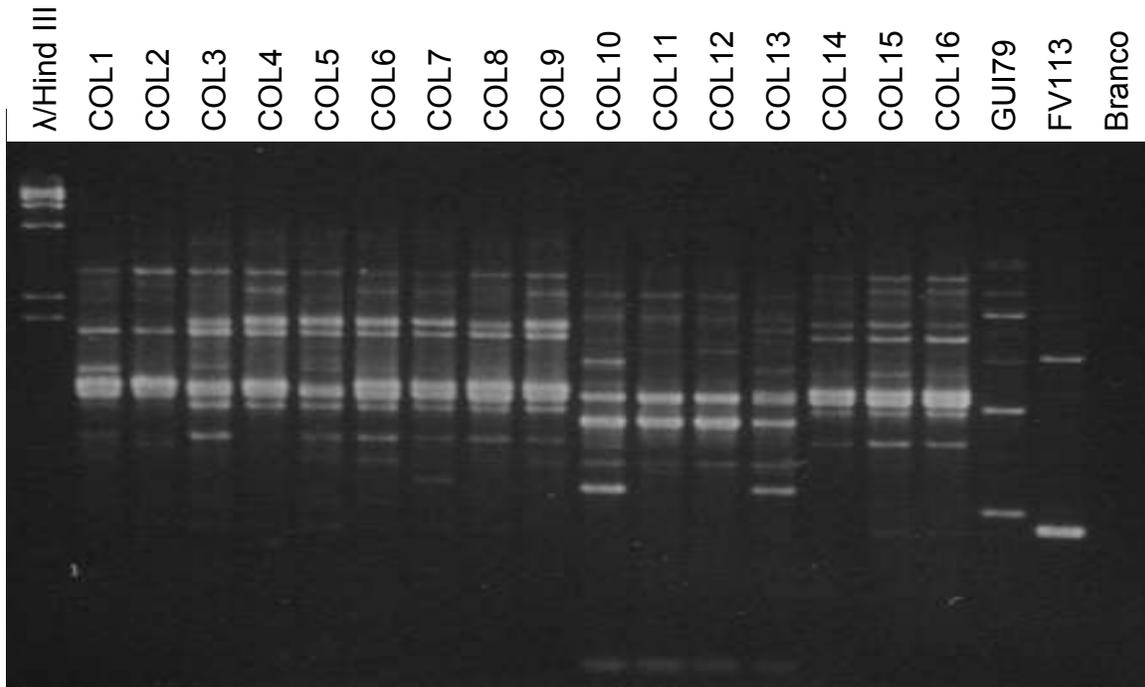


FIGURA 53: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de *Colletotrichum* sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o *primer* OPX-13.

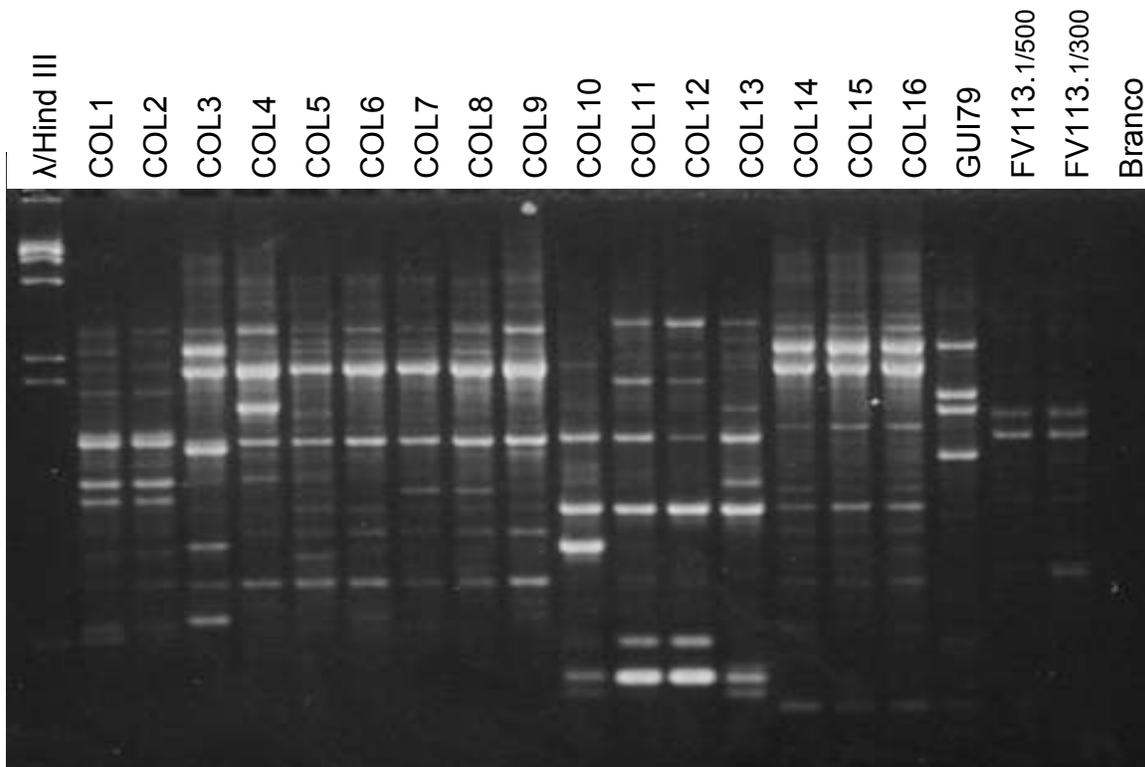


FIGURA 54: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de *Colletotrichum* sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o *primer* OPX-17.

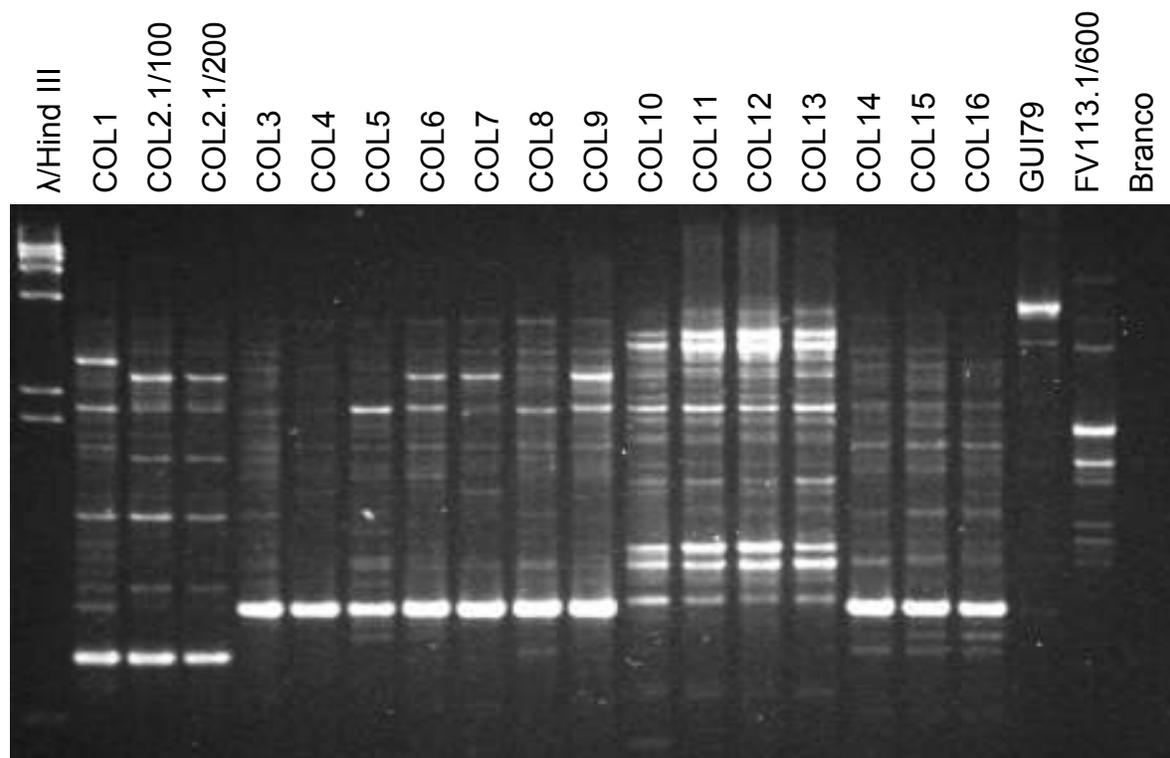


FIGURA 55: Perfil de RAPD obtido para 16 linhagens endofíticas de *Colletotrichum* sp. isoladas de folhas de espinheira-santa, utilizando o *primer* OPZ-19.

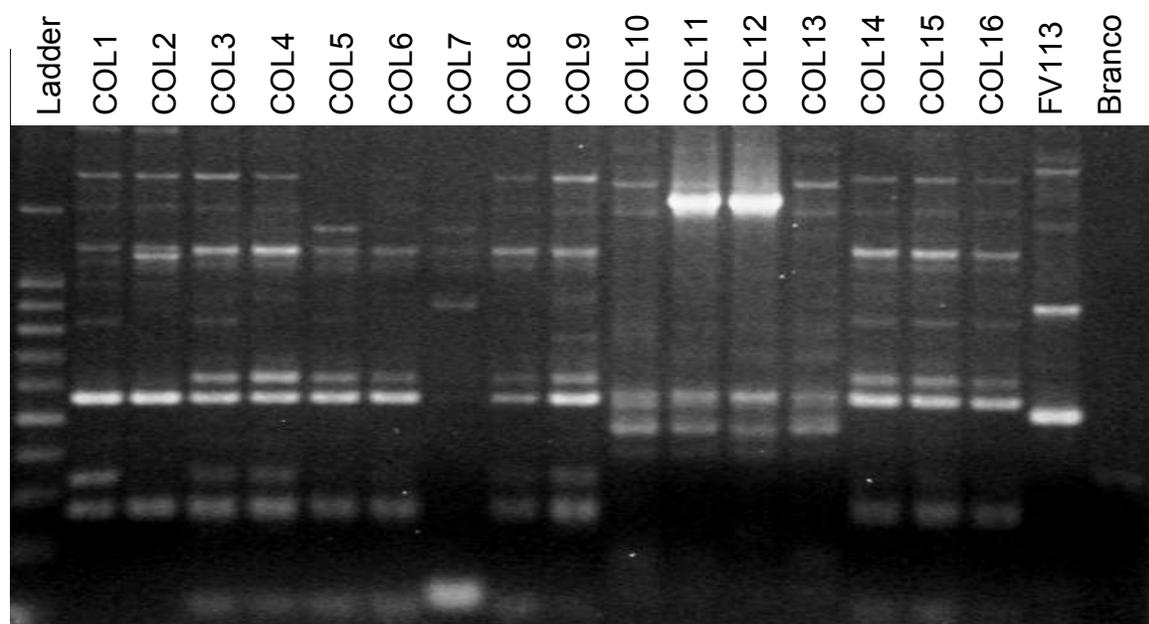
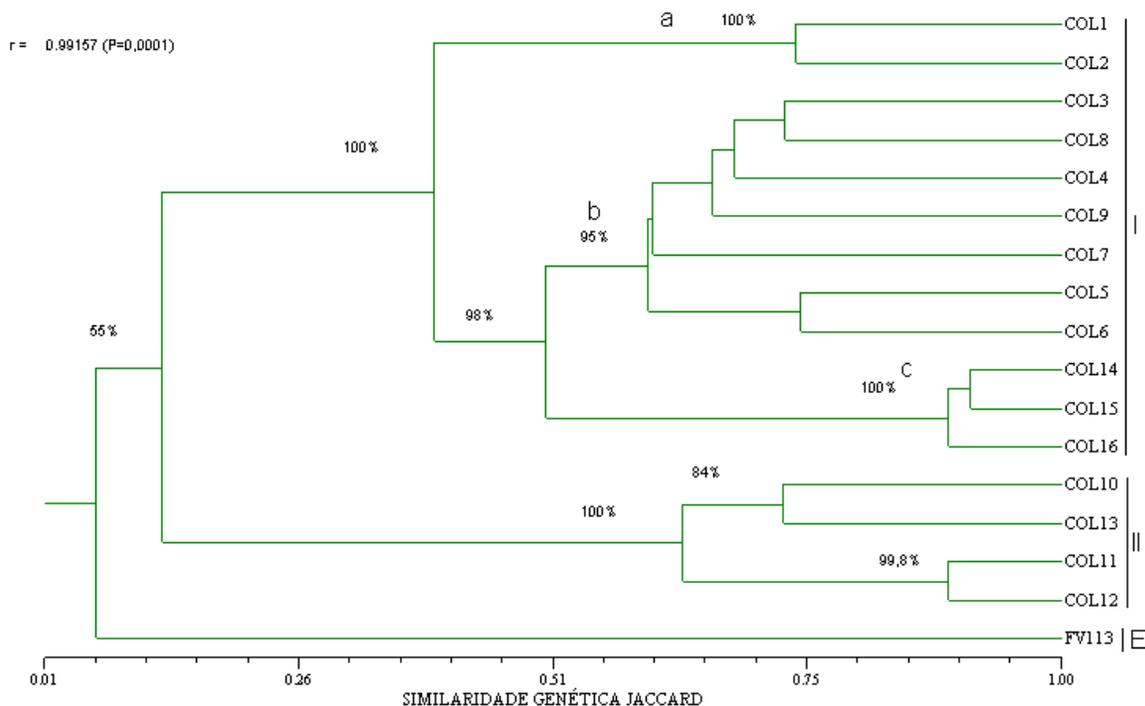


FIGURA 56: Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética de 16 isolados endofíticos de *Colletotrichum* sp. por meio de marcadores RAPD



Legenda: I - grupo 1, II - grupo 2, E - isolado FV113, incluído como grupo externo; os valores de *bootstrap* estão representados em porcentagens; somente os valores acima de 50% foram ilustrados; o valor de *r* representa o valor de correlação da matriz cofenética.

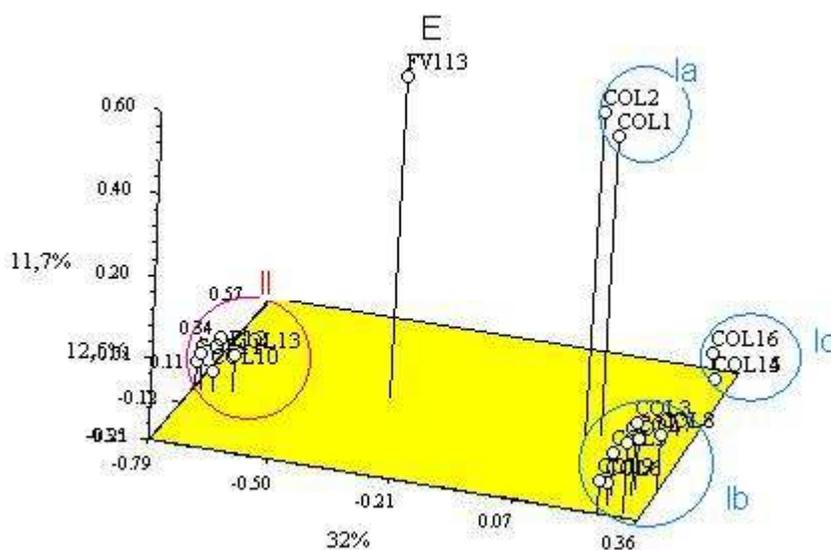
O coeficiente de correlação das matrizes de similaridade genética e cofenética, obtido pelo teste de Mantel, foi elevado ($r = 0,99157$ e $P = 0,0001$), indicando estar o dendrograma da figura 56 representando de forma adequada a matriz de similaridade genética obtida pelos marcadores RAPD.

Os valores de *bootstrap* (figura 56) conferem robustez aos agrupamentos obtidos. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) realizada (Tabelas 12 e 13) sugere a existência de pelo menos dois grupos de fungos geneticamente diferentes, sendo o primeiro subdividido em três subgrupos. O subgrupo Ia é composto pelos isolados COL1 e COL2; o subgrupo Ib é composto pelos isolados COL3, COL4, COL5, COL6, COL7, COL8 e COL9; e o subgrupo Ic pelos isolados COL14, COL15 e COL16. O grupo II é formado pelos isolados COL10, COL11, COL12 e COL13.

A linhagem FV113 foi utilizada como grupo externo, por não pertencer ao gênero *Colletotrichum*. Foram testadas duas colônias monospóricas diferentes do mesmo isolado, COL9 e COL12, que pertencem a grupos distintos na Figura 56. Estes resultados corroboram a necessidade de se trabalhar com linhagens puras dos microrganismos nas análises moleculares.

Os grupos e subgrupos sugeridos foram mais bem visualizados pela análise de componentes principais, ilustrada na Figura 57.

FIGURA 57: Análise de componentes principais da similaridade genética entre as linhagens endófitas de *Colletotrichum* sp. isoladas de espinheira-santa



Legenda: E - isolado FV113, grupo externo; Ia - subgrupo a, grupo I; Ib - subgrupo b, grupo I; Ic - subgrupo c, grupo I; II - grupo II

TABELA 12: AMOVA – Análise de Variância de Marcadores Moleculares

Fonte de Variação	G.L.	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
Entre grupos	1	25,22 Va	48,76
Entre subgrupos dentro de populações	2	14,56 Vb	28,16
Dentro de subgrupos	12	11,94 Vc	23,08

Pelos agrupamentos obtidos nas figuras 56 e 57 e pelos valores de diferenças das médias entre os subgrupos (Tabela 13), sugere-se o isolamento de pelo menos duas espécies de *Colletotrichum* neste trabalho (grupos I e II). Resultados preliminares do seqüenciamento de região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA sugerem que o isolado COL13 (grupo II) pertença à espécie *Glomerella cingulata* (anamorfo: *Colletotrichum gloeosporioides*), e o isolado COL6 (subgrupo Ib) corresponda à espécie *Colletotrichum boninense*².

LU et al. (2004) isolaram três espécies de *Colletotrichum* endofíticas, entre elas duas linhagens diferentes de *Glomerella cingulata*. Este também pode ser o caso neste trabalho.

TABELA 13: Diferença média entre os grupos e subgrupos obtidos na AMOVA

	Ia	Ib	Ic	II
Ia	17.00000	30.47619	45.33333	78.16667
Ib		29.90476	27.90476	74.92857
Ic			8.00000	93.66667
II				24.66667

²Comunicação pessoal de VICENTE, V. A. (2006)

5. CONCLUSÕES

- Foram isolados de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) diversos gêneros de fungos filamentosos e bactérias, inclusive actinomicetos, como endófitos.
- Constatou-se a presença de diversos endófitos, bactérias, actinomicetos e fungos filamentosos em sementes de *M. ilicifolia*, sendo os fungos dominantes em folhas e pecíolos e as bactérias dominantes em sementes.
- Os fungos identificados em nível de gênero que colonizaram com maior frequência os tecidos de *M. ilicifolia* foram *Alternaria* sp. e *Colletotrichum* sp.; nestes dois gêneros, bem como em *Bipolaris* sp. e *Guignardia* sp., verificou-se especificidade por tecido, sendo isolados quase que exclusivamente em folhas; já *Cladosporium* sp. não mostrou preferência, sendo isolado tanto de folhas, como pecíolos e sementes.
- Há grande potencial de produção de substâncias antimicrobianas em alguns isolados endofíticos, como o fungo FV113, não identificado, que inibiu o crescimento de *Fusarium* sp. I51-2, *Guignardia citricarpa* PC13 e *Micrococcus luteus* ATCC 9341.
- Verificou-se potencial para uso em controle biológico em alguns isolados endofíticos analisados, sugerindo-se estudos futuros mais

detalhados e com o emprego de outras metodologias, principalmente envolvendo alterações na morfologia e esporulação dos fitopatógenos.

- A partir dos dados de marcadores moleculares, sugerem-se pelo menos duas espécies de *Colletotrichum* habitando endofiticamente *M. ilicifolia*, inclusive *Colletotrichum boninense* e *Glomerella cingulata*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M. S.; FONG, H. H. S.; SOEJARTO, D. D.; DOBBERSTEIN, R. H.; WALLER, D. P.; MORENO-AZORERO, R. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Chromatography**, v. 213, p. 340-344, 1981.

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

ARAÚJO, J. M. de; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 4, p. 447-451, 2000.

ARAÚJO, W. L. de; 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, n. 3; p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L. de; MARCON, J.; MACCHERONI, W. Jr; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. de Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 3, n. 1, p. 40-65, abr. 2000.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; AA, H. A. van der; WEERDT, M. de; BROUWERSHAVEN, I. R. van; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI Jr., W.; BLANCO, C. G. de; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus blackspot fungus *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 5, p. 464-477, 2002.

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, s. 2, p. 325-332, 2001.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **Internacional Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiological Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2005.

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

BLANCO, C. G. de ***Guignardia citricarpa* Kiely: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Piracicaba, 1999. 200 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.

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

CALLAN, N. W.; MATHRE, D. E.; MILLER, J. B. Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* preemergence damping-off sh2 sweet corn. **Plant Disease**, v. 74, p. 368-372, 1990.

CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T. da; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 397-402, 2005.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZOU, S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 2, p. 147-152, 2005.

CARLINI, E. A. (Coord.) **Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (espinaheira-santa) e outras**. Brasília: CEME/AFIP, 1988. 87 p.

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

CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. Campinas, 1992. 253 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

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

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

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 321-322, 1996.

CHRISTO, D. De **Variabilidade Genética e Diferenciação Molecular de Isolados Endofíticos e Patogênicos de *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp.** Curitiba, 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná.

COELHO, A. S. G. **Software Bood v3.04**, 2005.

COOMBS, J. T.; MICHELSEN, P. P.; FRANCO, C. M. M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biological Control**, v. 29, p. 359-366, 2004.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus aquifolium* ("espinheira santa"). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 10, n. 6, 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. 44, n. 2, p. 157-160, 2004.

CORSINO, J.; BOLZANI, V. da S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-140, 1998.

CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F. de; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. da S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.

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

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. Análise de RAPD. In: MILACH, S. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach Editora, 1998. p. 107-116.

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

DAUCH, A. L.; WATSON, A. K.; JABAJI-HARE, S. H. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 51-64, 2003.

DERSO, E.; WALLER, J. M. Variation among *Colletotrichum* isolates from diseased coffee berries in Ethiopia. **Crop Protection**, v. 22, p. 561-565, 2003.

DICK, C. M.; HUTCHINSON, S. A. Biological activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, v. 211, p. 868, 1966.

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, v. 166, 2003. *In Press*

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lawrence, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FERREIRA, P. M.; OLIVEIRA, C. N.; OLIVEIRA, A. B.; 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.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v. 122, p. 2999-305, 1992.

FOKKEMA, N. J. Competition for endogenous and exogenous nutrients between *Sporobolomyces roseus* and *Cochliobolus sativus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 2463-2468, 1984.

FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S. Espinheira-santa: do estudo à viabilização de um fitoterápico brasileiro contra úlcera gástrica. **Revista Racine**, São Paulo, set./out./nov., p. 67-69, 1997.

GALVÃO, R. M. S. **Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais frequentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota*.** São Carlos, 1998. 151 f. Tese (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos.

GAO, X.; ZHOU, H.; XU, D.; YU, C.; CHEN, Y.; QU, L. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 255-266, 2005.

GIBBS, J. N. A study of the epiphytic growth habit of *Fomes annosus*. **Annals of Botany**, v. 31, p. 755-774, 1967.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD.** Curitiba, 1995. 115 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) – Universidade Federal do Paraná.

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

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.

GOODWIN, P. H.; ANNIS, S. L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2482-2486, 1991.

GUIMARÃES, V. C. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paulinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mar.) Ducke e análise da variabilidade genética detectada por marcadores RAPD no endófito *Glomerella cingulata*.** Manaus, 1998. 115 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A.; PORCO, J. A.; TOMER, D. P.; ONEILL, K. L.; HEIDER, E. M.; GRANT, D. M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, mar. 2003.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v. 129, n. 2, p. 117-125, 1995.

HOLMES, G. J.; ECKERT, J. W.; PITT, J. I. Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of Citrus fruits. **Phytopathology**, v. 84, p. 719-727, 1994.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalotaxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 163-167, 2001.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the ágar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, p. 218-224, 1971.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. New triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 47, p. 6881-6882, 1990.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3713-3716, 1991.

JANSEN, T. C. **Isolamento e identificação de bactérias endofíticas de plantas do gênero *Maytenus* M. Reiss (Espinheira-Santa) e suas micromoléculas bioativas.** São Carlos, 2002. 106 f.. Tese (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, *In press*, 2004.

KAWAMOTO, S. O.; LORBEER, J. W. Protection of onion seedlings from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. **Plant Disease**, v. 60, p. 189-191, 1976.

KELEMU, S.; SKINNER, D. Z.; BADEL, J. L.; MORENO, C. X.; RODRIGUEZ, M. X.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J.; CHAKRABORTY, S. Genetic diversity in South American *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 261-272, 1999.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL Jr., V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico**. 5^a. edição. 2001. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro, RJ.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 772-786, 2002.

KÜSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v. 202, p. 928-929, 1964.

KUTNEY, J. P.; BEALE, M. H.; SALISBURY, P. J.; STUART, K. L.; WORTH, B. R.; TOWNSLEY, P. M.; CHALMERS, W. T.; NILSSON, K.; JACOLI, G. G. Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of *Maytenus buchananii*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 653-657, 1981.

LARDNER, R.; JOHNSTON, P. R.; PLUMMER, K. M.; PEARSON, M. N. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. **Mycological Research**, v. 103, n. 3, p. 275-285, 1999.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 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.; IRWIN, J. A. G. Comparative studies on *Phytophthora megasperma* isolates from chickpea collected in Australia and Spain. **Mycological Research**, v. 98, n. 11, p. 1284-1290, 1994.

LIMA, O. G. de; D'ALBUQUERQUE, I. L.; COELHO, J. S. de B.; MARTINS, D. G.; LACERDA, A. L.; MACIAL, G. M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores –Maitenina, novo antimicrobiano com ação antineoplásica, isolado de celastrácea de Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 9, n. 1-2, p. 17-25, 1969.

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

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

LONGO, A. C. **Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae***. Piracicaba, 1996. 101 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo.

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

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.

MAGALHÃES, A. A. da S. **Isolamento e variabilidade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus sucuuba* SPRUCE (WOOD) Apocynaceae**. São Carlos, 2001. 130 f. Tese (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

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

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

MARTINEZ-CULEBRAS, P. V.; BARRIO, E.; SUAREZ-FERNANDEZ, M. B.; GARCIA-LOPEZ, M. D.; QUEROL, A. RAPD analysis of *Colletotrichum* species isolated from strawberry and the design of specific primers for the identification of *C. frágariae*. **Journal of Phytopathology**, v. 150, p. 680-686, 2002.

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

MEAUX, J. de; NEEMA, C. Putative Recognition Domain of Resistance Gene Candidates in Wild Bean Populations. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, p. S90–S102, of Diversity at the 2003,

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

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.

NICHOLSON, P.; REZANOON, H. N. The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*. **Mycological Research**, v. 98, n. 1, p. 13-21, 1994.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARAITE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. **Mycological Research**, v. 106, n. 5, p. 579-593, 2002.

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

OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 29-41, 1991.

OLIVEIRA, J. F. de; BRAGA, A. C. S.; OLIVEIRA, M. B. N. de; ÁVILA, A. S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; CARDOSO, V. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; BERNARDO-FILHO, M. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 179-184, 2000.

ORABI, K. Y.; AL-QASOUMI, S. I.; EL-OLEMY, M. M.; MOSSA, J. S.; MUHAMMAD, I. Dihydroágarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 475-480, 2001.

PAUL, B. A new species of *Pythium* isolated from burgundian vineyards and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of the grey mould disease. **FEMS Microbiological Letters**, v. 234, n. 2, p. 269-274, 2004.

PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DIÉZ MATAS, M. T.; GARCÍA, J. B.; GONZÁLEZ DEL VAL, A.; GONZÁLEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; MARTÍN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, v. 102, n. 6, p. 775-761, 1998.

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

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v. 85, n. 3, p. 362-364, 1993.

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

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

PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J., FOTO, R.; RYCE, K. D.; LUMYONG, S. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, v.18, p.117-1333, 2005.

POSSIEDE, Y. M. **Estudos morfofisiológicos e genéticos em *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp.** Curitiba, 2004. 129 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná.

POWELL, R. G.; SMITH Jr., C. R. Antitumor agents from higher plants. In: SWAIN, T.; KLEIMAN, R. **The Resource Potential in Phytochemistry – Recent Advances in Phytochemistry**. v. 14. New York, Plenum Press, 1979. 215 p.

PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BAMBERG, D. D. V.; LOHMANN, S.; FRANÇA, S. D. C.; GROTH, I., SCHLEGEL, B., MOLLMANN, U.; GOLLMICK, F.; GRAFÉ, U.; LEISTNER, E. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. **Planta**, v. 216, n. 1, p. 162-167, 2002.

PULLEN, C. B.; SCHMITZ, P.; HOFFMANN, D.; MEURER, K.; BOETTCHER, T.; BAMBERG, D. von; PEREIRA, A. M., FRANÇA, S. C.; HAUSER, M.; GEERTSEMA, H.; WYK, A. van; MAHMUD, T.; FLOSS, H. G.; LEISTNER, E. Occurrence and non-detectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytenus* and *Putterlickia*. , **Phytochemistry**, v. 62, p. 377-387, 2003.

QUEIROGA, C. L.; SILVA, G. F.; DIAS, P. C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E. de Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 465-468, 2000.

RADOMSKI, M. I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa – Paraná.** Curitiba, 1998. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciências do Solo) – 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. **Variabilidade genética por RAPD em fungos endofíticos do gênero *Penicillium* provenientes de *Zea mays* L.** Curitiba, 1995. 90 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; MONOD, M.; FRENK, E. Bioautographic ágar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-203, 1991.

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

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K. D. **Diversity of Tropical Microfungi.** Hong Kong, University of Hong Kong Press, 1997. p. 57-69.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, K. F.; DRANDAROV, K.; HEERKLOTZ, J.; HESSE, M.; WERNER, C. Guignardic acid, a novel type of secondary metabolite produced by the endophytic fungus *Guignardia* sp.; isolation, structure elucidation, and asymmetric synthesis. **Helvetica Chimica Acta**, v. 84, p. 3766-3772, 2001.

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

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

SAHA, T.; KUMAR, A.; RAVINDRAN, M.; JACOB, C. K.; ROY, B.; NAZEER, M. A. Identification of *Colletotrichum acutatum* from rubber using random amplified polymorphic DNAs and ribosomal DNA polymorphisms. **Mycological Research**, v. 106, n. 2, p. 215-221, 2002.

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

SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 237-239, 1998.

SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2005.

SANTANA, C. F. de; ASFORA, J. J.; COTIAS, C. T. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, n. 2, p. 37-49, 1971.

SCHÄFER, C.; WÖSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology**, v. 136, p. 124-136, 1992.

SCHARDL, C. L. *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 33, p. 69-82, 2001.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000: a software for population genetics data analysis**. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory/University of Geneva, 2000.

SCOTT, B. *Epichloë* endophytes: fungal symbionts of grasses. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p. 393-398, 2001.

SCRUGLI, A.; COGONI, A.; MELIS, G. V.; DEIDDA, D.; POMPEI, R. Attività biologica di funghi endofitici di Orchidaceae spontanee della Sardegna. Biologic activity of endophytic fungi isolated from sardinian orchid roots. **Micologia Italiana**, v. 29, n. 2, p. 29-37, 2000.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 239-249, 2004.

SEYMOUR, F. A.; CRESSWELL, J. E.; FISHER, P. J.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HAAG, H.; TALBOT, N. J. The influence of genotypic variation on metabolite diversity in populations of two endophytic fungal species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 7, p. 721-734, 2004.

SHARMA, P. N.; Kaur, M.; SHARMA, O. P.; SHARMA, P.; PATHANIA, A. morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici*, the cause of fruit rot of chillies in the subtropical region of North-Western India. **Journal of Phytopathology**, v. 153, p. 232-237, 2005.

SHIMIZU, M.; NAKAGAWA, Y.; SATO, Y.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H.; YOSHIDA, R.; KUNOH, H. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from *Rhododendron* and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, v. 66, n. 4, p. 360-366, 2000.

SHRESTHA, K.; STROBEL, G. A.; SHRIVASTAVA, S. P.; GEWALI, M. B. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal. **Planta Medica**, v. 67, n. 4, p. 374-376, 2001.

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

SILVA-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, n. 1, p. 27-32, 2002.

SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 3, p. 220-224, 1991.

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

SOUZA, A. Q. L. **Fungos endofíticos de plantas tóxicas da Amazônia, *Palicourea longiflora* (AUBL.) RICH e *Strychnos cogens* BENTHAM.**, São Carlos, 2001. 102 f. Tese (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos.

SOUZA, A. Q. L. de; SOUZA, A. D. L. de; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM-PINHEIRO, M. L.; 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 Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiaopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.

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

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

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

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

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

SUMAM, A.; SHASANY, A. K.; SINGH, M.; SHAHI, H. N.; GAUR, A.; KHANUJA, S. P. S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 39-45, 2001.

SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 88-90, 2002.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2987-2998, 2005.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**, v.151, n. 5, p. 1691-1695, 2005.

VALÉRIO, H. M.; RESENDE, M. A.; WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; CASELLA, C. R. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola*. **Mycopathologia**, v. 159, p. 449-459, 2005.

VIDAVER, A. K.; MATHYS, M. L.; THOMAS, M. E.; SCHUSTER, M. L. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, p. 705-713, 1972.

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

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.

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

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

WICKLOW, D. T.; ROTH, S.; DEYRUP, S. T.; GLOER, J. B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v. 109, p. 610-618, 2005.

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

ZHAO, P. J.; PAN, L. M.; LI, G. H.; ZHU, N.; SHEN, Y. M. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp is9131. **Archives of Pharmacial Research**, v. 28, n. 11, p. 1228-1232, 2005.

ZHU, N.; SHARAPIN, N.; ZHANG, J. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 265-268, 1998.

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