



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**MICROBIOTA ENDOFÍTICA DA PLANTA MEDICINAL *Equisetum*
arvense L. E SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

FABÍOLA GOMES DA SILVA

RECIFE

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**MICROBIOTA ENDOFÍTICA DA PLANTA MEDICINAL *Equisetum*
arvense L. E SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

Fabíola Gomes da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada
Orientadora: Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira
Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta

RECIFE

2012

Silva, Fabíola Gomes da

Micobiota endofítica da planta medicinal *Equisetum arvense* L. e seu potencial antimicrobiano/ Fabíola Gomes da Silva. – Recife: O Autor, 2012.

68 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Neiva Tinti de Oliveira

Coorientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2012.

Inclui bibliografia

- 1. Fungos 2. Plantas medicinais- uso terapêutico 3. Pteridófita I. Oliveira, Neiva Tinti de II. Motta, Cristina Maria de Souza III. Título.**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-120

**MICROBIOTA ENDOFÍTICA DA PLANTA MEDICINAL *Equisetum*
arvense L. E SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

FABÍOLA GOMES DA SILVA

Data da defesa: 09 de março de 2012

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira - Orientadora
Departamento de Micologia (UFPE)

Profa. Dra. Patrícia Vieira Tiago
Departamento de Micologia (UFPE)

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)

MEMBROS SUPLENTE

Profa. Dra. Uided Maaze Tibúrcio Cavalcante
Departamento de Micologia (UFPE)

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza
Departamento de Biologia (UFRPE)

Ofereço:

*A Jesus Cristo, porque o
Senhor escolheu os cravos...*

Dedico:

Aos meus pais Luiz e Maria.

*Os que semeiam em lágrimas segarão com alegria.
Aquele que leva a preciosa semente, andando e
chorando, voltará sem dúvida com alegria, trazendo
consigo os seus molhos.*

Salmos 126: 5-6

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, por suas misericórdias se renovarem a cada manhã. E por ter permitido a realização de mais um dos meus sonhos.

Aos meus amados pais, Luiz e Maria, pelo amor, carinho, paciência, confiança e apoio em todos os momentos.

A minha amada irmã, Flávia pelo companheirismo e ajuda.

Ao José Antônio de Sousa Pereira Júnior, por ter despertado em mim o amor e o interesse pelos fungos. Além do exemplo de dedicação, profissionalismo e dignidade pessoal.

Aos meus amados amigos, Elaine, Emanuela, Íris, Izabella, Marília, Priscila, Renata, Rita, Thiago, Viviane e Wilma pelas palavras de incentivo. Vocês são estrelas brilhantes no meu caminho, sendo participantes diretos da minha vitória.

A Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira, por ter aceitado me orientar neste trabalho, além da sua amizade, encorajamento e enorme paciência.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, por toda atenção dispensada.

As professoras Débora Lima e Maria Fernandes pela ajuda na identificação dos fungos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade oferecida na realização deste trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, pelas lições e conhecimentos transmitidos.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos Giovanna Guterres e aos estagiários da secretaria Anita, Habacuque, Mariana e Wanessa pelas facilidades e atenção concedidas.

A todos os colegas da minha turma, pelos momentos que passamos juntos, foi muito bom estudar com vocês e dividir momentos de alegria e angústia.

Aos colegas do laboratório de fungos fitopatogênicos, Alide, Bárbara, Benny, Elaiza, Emanuelle, Mariele, Martival e Susane pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Micologia, Bruno, Daniela, Danielle, Débora, Diogo, Marcela, Maria, Paula, Phelipe, Thaís e Virgínia, sempre prestativos e atenciosos comigo.

Ao Prof. Sidney Bastos, pela amizade, cuidados e ensinamentos dispensados.

A Chefia do Departamento de Micologia da UFPE, representada pelas professoras Dra. Rejane Pereira Neves e Dra. Oliane Maria Correia Magalhães, pelas facilidades concedidas e dedicação para o bom funcionamento do mesmo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior de tecidos vegetais, colonizando-os intra e/ou intercelularmente, durante algum período do seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes aos seus hospedeiros. Nos últimos anos esses microrganismos têm despertado grande interesse devido ao seu potencial de utilização como fonte de novas moléculas bioativas que podem ser aplicadas na medicina, na indústria e na agricultura. *Equisetum arvense* é uma planta medicinal que atua como remineralizante, diurética, cicatrizante, desintoxicante, adstringente e anticancerígena. Tendo em vista que as plantas medicinais com ação antimicrobiana podem ser hospedeiras de fungos endofíticos com tais propriedades, o presente trabalho teve como objetivos verificar a composição dos fungos endofíticos associados à planta medicinal *E. arvense* e avaliar o potencial antimicrobiano desses fungos contra microrganismos de importância agrícola e médica. Duas coletas de seis amostras de *E. arvense* foram realizadas na horta medicinal do Instituto Agrônomo de Pernambuco, nos meses de julho e outubro de 2010 correspondendo aos períodos de chuva e de estiagem, respectivamente. No laboratório de fungos fitopatogênicos da Universidade Federal de Pernambuco foram realizados os processos de desinfestação superficial das amostras dos tecidos vegetais (caule e raiz), isolamento e identificação dos fungos endofíticos, bem como os testes antimicrobianos. Um total de 235 fungos endofíticos foram isolados e destes, 205 foram identificados. Foram obtidos 22 taxa, 17 identificados ao nível de espécie e cinco ao nível de gênero. Hyphomycetes foi o grupo de fungos com maior número de representantes. *Fusarium* e *Colletotrichum gloeosporioides* foram o gênero e a espécie mais frequentes, com 26,8% e 25,11% de frequência relativa de isolamento, respectivamente. Verificou-se através da técnica de cultura pareada que nenhum dos nove fungos endofíticos testados (*Curvularia lunata* var. *aeria*, *C. pallescens*, *C. brachyspora*, *Cladosporium oxysporum*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium solani*, *F. verticillioides* e *Gliomastix murorum* var. *felina*) apresentou capacidade antagônica contra os fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Sclerotium rolfsii*. Os mesmos fungos endofíticos foram submetidos a ensaios em meio sólido e oito apresentaram ação antimicrobiana a pelo menos um dos microrganismos de importância médica utilizados (as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e a levedura: *Candida albicans*). *F. solani* apresentou o maior halo de inibição para *B. subtilis*. Isso demonstra a potencialidade bioativa de fungos endofíticos isolados de *E. arvense* contra bactérias e fungos patogênicos ao homem.

Palavras-chave: *Equisetum arvense*; Fungos endofíticos; Diversidade; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live inside plant tissues, colonizing intra and/or intercellular, during some period of their life cycle, without causing any apparent injury to their hosts. In recent years these organisms have attracted great interest due to its potential use as a source of new bioactive molecules that can be applied in medicine, industry and agriculture. *Equisetum arvense* is a medicinal plant that acts as remineralizing, diuretic, healing, detoxifying, astringent and anti-cancer. Considering that medicinal plants with antimicrobial activity can be hosts for endophytic fungi with such properties, the aims of this study was to verify the composition of endophytic fungi associated with medicinal plant *E. arvense* and evaluate the antimicrobial potential of these fungi against microorganisms for medical and agricultural importance. Two collections of six samples of *E. arvense* were carried in the medicinal garden of Agronomy Institute of Pernambuco, in the months of July and October 2010 corresponding to periods of rain and drought, respectively. In the laboratory of phytopathogenic fungi of the Federal University of Pernambuco were performed processes of surface sterilized of plant tissues (stem and root), isolation and identification of endophytic fungi as well as antimicrobial testing. A total of 235 endophytic fungi were isolated and these, 205 were identified. Were obtained 22 taxa, 17 identified to species level and five to the genus level. Hyphomycetes fungi was the group with the largest number of representatives. *Fusarium* and *Colletotrichum gloeosporioides* were genus and species more frequent with 26.8% and 25.11% relative frequency of isolation, respectively. It was found by dual culture technique that none of the nine endophytic fungi tested (*Curvularia lunata* var. *aeria*, *C. pallescens*, *C. brachyspora*, *Cladosporium oxysporum*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium solani*, *F. verticillioides* and *Gliomastix murorum* var. *felina*) showed antagonistic ability against phytopathogenic fungi *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Sclerotium rolfsii*. The same endophytic fungi were tested in solid medium and eight showed antimicrobial activity to at least one of the microorganisms of medical importance used (bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the yeast, *Candida albicans*). *F. solani* showed the highest inhibition for *B. subtilis*. This demonstrates the potential of bioactive endophytic fungi isolated from *E. arvense* against bacteria and fungi pathogenic to human.

Key-words: *Equisetum arvense*; Endophytic fungi; Diversity; Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Equisetum arvense</i> L.....	26
Figura 2. Horta medicinal do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).....	29
Figura 3. Medição do crescimento micelial em dois sentidos ortogonais.....	32
Figura 4. Distribuição dos discos de micélio-ágar dos fungos endofíticos (A) e fitopatogênicos (B), em meio BDA, para ensaio de antagonismo.....	33
Figura 5. Frequência relativa de isolamento dos grupos de fungos endofíticos isolados de caule e de raiz de <i>Equisetum arvense</i> nas coletas.....	39
Figura 6. Frequência relativa de isolamento dos 14 gêneros de fungos endofíticos isolados de caule e raiz de <i>Equisetum arvense</i> nas coletas.....	40
Figura 7. Densidade média ($\pm$ erro padrão) de fungos endofíticos isolados de <i>Equisetum arvense</i> nas coletas 1 (julho) e 2 (outubro) de 2010. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.....	41
Figura 8. Porcentagem de fungos endofíticos isolados de <i>Equisetum arvense</i> na coleta 1.....	42
Figura 9. Porcentagem de fungos endofíticos isolados de <i>Equisetum arvense</i> na coleta 2.....	42
Figura 10. Pareamento entre os isolados de <i>Curvularia. lunata</i> var. <i>aeria</i> (A), <i>Curvularia brachyspora</i> (B), <i>Cladosporium oxysporum</i> (C), <i>Fusarium verticillioides</i> (D) na esquerda e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> na direita.....	46
Figura 11. Microscopia do encontro entre <i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> ¹ e <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ² . Setas laranjas: hifas de 1; Setas vermelhas: hifas de 2; Setas pretas: conídios de 1; Setas brancas: conídios de 2.....	47
Figura 12. Pareamento entre os isolados de <i>Curvularia. lunata</i> var. <i>aeria</i> (A), <i>Curvularia brachyspora</i> (B), <i>Curvularia pallescens</i> (C), <i>Cladosporium oxysporum</i> (D) na esquerda e <i>Sclerotium rolfsii</i> na direita.....	49
Figura 13. Halos de inibição de <i>Bacillus subtilis</i> formados em presença de fungos endofíticos isolados de <i>Equisetum arvense</i> . A: <i>Gliomastix murorum</i> var. <i>felina</i> ; B: <i>Curvularia pallescens</i> ; C: <i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> ; D: <i>Fusarium verticillioides</i> ; E: <i>Curvularia brachyspora</i> ; F: <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; G: <i>Fusarium solani</i> ; H: <i>Cladosporium oxysporum</i> e I: <i>Cladosporium sphaerospermum</i> . *Controle.....	51

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Precipitação pluviométrica e temperaturas máxima e mínima no município de Recife, Pernambuco.....	30
Tabela 2. Número total de isolados e frequência relativa de isolamento dos fungos endofíticos obtidos de caule e raiz da planta medicinal <i>Equisetum arvense</i> nas coletas.....	37
Tabela 3. Fungos endofíticos isolados da planta medicinal <i>Equisetum arvense</i> nas coletas em relação ao tecido vegetal analisado.....	43
Tabela 4. Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia) dos isolados fúngicos fitopatogênicos e endofíticos em meio BDA ¹	45
Tabela 5. Classes de antagonismo para os isolados de fungos endofíticos encontrados em <i>Equisetum arvense</i> contra o fungo fitopatogênico <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	46
Tabela 6. Classes de antagonismo para os isolados de fungos endofíticos encontrados em <i>Equisetum arvense</i> contra o fungo fitopatogênico <i>Sclerotium rolfsii</i>	48
Tabela 7. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de <i>Equisetum arvense</i> frente a quatro bactérias e a um fungo patogênicos ao homem.....	51

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Microrganismos Endofíticos.....	15
2.2. Fungos Endofíticos.....	17
2.2.1. Interação Ecológica entre Fungos Endofíticos e Plantas Hospedeiras.....	18
2.2.2. Ocorrência de Fungos Endofíticos em Plantas Medicinais.....	20
2.2.3. Atividade Antimicrobiana de Fungos Endofíticos.....	22
2.3. <i>Equisetum arvense</i> L.....	25
2.3.1. Características Gerais.....	25
2.3.2. Fungos Endofíticos Associados a <i>Equisetum arvense</i>	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Coleta do Material Vegetal.....	29
3.2. Desinfestação das Amostras e Isolamento dos Fungos Endofíticos.....	30
3.3. Identificação dos Fungos Endofíticos.....	31
3.4. Avaliação <i>in vitro</i> de Fungos Endofíticos com Ação Antagônica contra Fungos Fitopatogênicos.....	31
3.4.1. Fungos Endofíticos e Fitopatogênicos Utilizados.....	31
3.4.2. Análise da Velocidade do Crescimento Micelial do Isolados.....	32
3.4.3. Técnica de Cultura Pareada.....	33
3.5. Atividade Antimicrobiana dos Fungos Endofíticos frente a Isolados de Importância Médica.....	34
3.6. Análise dos Dados.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1. Fungos Endofíticos isolados da Planta Medicinal <i>Equisetum arvense</i>	36
4.2. Atividade Antagônica de Fungos Endofíticos contra Fungos Fitopatogênicos.....	44
4.2.1. Avaliação do Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM).....	44
4.2.2. Pareamento dos Fungos Endofíticos contra Fungos Fitopatogênicos.....	45
4.3. Ação Antimicrobiana dos Fungos Endofíticos frente a Isoladas de Importância Médica.....	50
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

Evolutivamente as plantas vêm desenvolvendo complexos mecanismos adaptativos, muitos destes somente possíveis, graças às interações com os microrganismos. Entre esses destacam-se os fungos endofíticos, que vivem em associação íntima no interior de tecidos de plantas vivas sem causar danos aparentes aos seus hospedeiros (Strobel, 2003). Atualmente os fungos endofíticos têm sido vistos como uma ótima fonte de novos produtos naturais bioativos úteis na agricultura, indústria e medicina uma vez que apresentam uma diversidade de adaptações a nichos ecológicos únicos e incomuns (Schulz *et al.*, 2002; Strobel e Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Bandara *et al.*, 2006).

As interações endofítico/planta, ainda não estão totalmente compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas os fungos endofíticos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Souza *et al.*, 2004).

Os fungos endofíticos são conhecidos por produzirem substâncias de grande relevância capazes de inibir ou matar uma variedade de agentes causadores de doenças, bem como, bactérias e fungos que afetam a população humana, os animais e as plantas (Demain, 1999). Dessa forma, a micobiota endofítica obtida de plantas medicinais têm sido reconhecidamente alvo de isolamento, caracterização e análise por apresentar grande potencial para exploração e descoberta de novas moléculas bioativas, pois esses microrganismos podem sintetizar compostos com propriedades semelhantes aos do seu hospedeiro (Kumar e Hyde, 2004; Tejesvi *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2010).

Nesse contexto, estudos sobre a potencialidade dos fungos endofíticos mostram-se relevantes tanto para uso no controle biológico de doenças e pragas, como para aplicação no setor biotecnológico ou indústria farmacêutica de produtos bioativos obtidos desses microrganismos, como é o caso dos antibióticos utilizados no tratamento de infecções em humanos (Stierle *et al.*, 1995).

Equisetum arvense é uma planta medicinal originária da Europa que tem uma utilização bastante diversificada, desde o uso em infusões de caráter terapêutico até a participação em diversas fórmulas de medicamentos alopáticos (Ferreira, 2001). Esta

planta pode atuar como remineralizante, diurética, cicatrizante, desintoxicante, adstringente, anticancerígena, antifúngica e antibacteriana (Mitich, 1992; Franco, 2001; Sapei *et al.*, 2007).

Deste modo, caso o fungo endofítico tenha habilidade de produzir o mesmo metabólito bioativo que sua planta hospedeira, isto reduziria a necessidade de coletar plantas raras, as que apresentam crescimento reduzido ou estão ameaçadas de extinção, e preservaria a biodiversidade. Além disso, é reconhecido que uma fonte microbiana de um produto valorizado pode ser mais fácil e econômico para produzir, reduzindo eficazmente seu custo no mercado (Stierle *et al.*, 1993).

Tendo em vista que as plantas medicinais com ação antimicrobiana podem ser hospedeiras de endofíticos com tais propriedades (Kusari *et al.*, 2008), o presente trabalho teve como objetivos verificar a composição dos fungos endofíticos associados à planta medicinal *E. arvense*, que apresenta comprovada ação antifúngica e antibacteriana e avaliar o potencial antimicrobiano desses fungos contra microrganismos de interesse agrícola e de importância médica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Microrganismos Endofíticos

Os endofíticos compõem um grupo de microrganismos, principalmente fungos e bactérias, com habilidades únicas e características de interesse fora e dentro do hospedeiro, sendo potenciais fontes de estudo que fascinam pesquisadores do mundo todo. Este grupo é conhecido a mais de um século, contudo, somente nas últimas décadas houve um crescimento das pesquisas em decorrência, principalmente do seu potencial biotecnológico, como fontes promissoras de enzimas e produtos farmacêuticos (Araújo *et al.*, 2002). A maior biomassa viva no planeta é formada por comunidades microbianas, que são responsáveis por muitos processos essenciais para a manutenção da vida nas condições ambientais atuais, sendo os microrganismos endofíticos parte integrante dessas comunidades (Andreote *et al.*, 2008).

O termo endofítico é derivado do grego (*éndon* = dentro + *phytón* = planta), e tem sido utilizado para definir os microrganismos que convivem simbioticamente com a planta hospedeira (Schulz e Boyle, 2005). De Barry, foi quem introduziu o termo ao se referir a “Qualquer organismo encontrado no interior de tecidos vegetais” (De Barry, 1968 *apud* Hyde e Soyong, 2008) englobando, desta forma, os fitopatogênicos. Carroll (1968 *apud* Hyde e Soyong, 2008) restringiu o uso do termo endofítico a organismos endosimbiontes que colonizam assintomaticamente os tecidos internos de plantas, ou seja, sem causar danos aparentes, excluindo as micorrizas e os fungos fitopatogênicos. Petrini (1991) propôs a expansão da definição de Carroll, incluindo todos os microrganismos que, pelo menos em algum período do seu ciclo de vida, colonizam os tecidos vegetais aéreos, sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro. Neste conceito, foram excluídas as bactérias fixadoras de nitrogênio, os fungos micorrízicos e microrganismos que colonizam o interior da raiz.

Outra definição, proposta por Hallmann *et al.* (1997), sugere que endofíticos podem ser considerados microrganismos isolados de tecidos vegetais desinfestados superficialmente ou do interior destes, e que não causam danos aparentes à planta, incluindo nesta definição todos os microrganismos que colonizam de forma sistêmica ou localizada o interior de tecidos vegetais e que em momento algum levam ao desenvolvimento de sintomas relacionados à patogenicidade. Azevedo e Araújo (2007)

definem endofítico como sendo todo microrganismo, cultivável ou não, que coloniza o interior da planta hospedeira e que não causa danos aparentes e nem forma estruturas externas visíveis. Finalmente, Mendes e Azevedo (2007) ampliaram a definição considerando todos os microrganismos cultiváveis ou não e que não causam danos aparentes, como endofíticos. Os autores ainda os dividem em dois tipos: Tipo I, que não produzem estruturas externas na planta hospedeira e Tipo II, que produzem estruturas externas à planta.

Os endofíticos se distinguem dos epifíticos (aqueles que vivem na superfície) e dos fitopatogênicos (que causam doenças). Na realidade existe um gradiente com interfaces entre endofíticos, epifíticos e fitopatogênicos que é parte da própria Biologia (Peixoto-Neto *et al.*, 2002). Azevedo *et al.* (2002) relatam que a diferenciação entre endofíticos, epifíticos e fitopatogênicos tem significado meramente didático, dependendo assim do nicho ocupado pelo microrganismo em determinado estágio de sua interação com o hospedeiro. Para penetrar na planta hospedeira um endofítico pode viver por certo tempo como epífito e dentro da planta em certas condições de estresse, pode tornar-se patogênico (Araújo *et al.*, 2010).

Os microrganismos endofíticos já foram relacionados com diversos tipos de hospedeiros, entre eles plantas herbáceas (Taechowisan *et al.*, 2003), plantas florestais tropicais (Strobel, 2002), plantas cultivadas (Melnroy e Kloepper, 1995), plantas medicinais (Huang *et al.*, 2001) e plantas aquáticas (Chen *et al.*, 2003). Geralmente, de dezenas a centenas de isolados podem ser obtidos de um único vegetal e, a partir deste, pelo menos uma espécie se mostra específica, confirmando o fato que os endofíticos são um componente relevante na diversidade microbiana (Tan e Zou, 2001; Strobel e Daisy, 2003).

A diversidade dos microrganismos endofíticos é alta, em particular, no Brasil, por possuir uma das maiores floras do mundo, além de se localizar em grande parte na região tropical que ao que tudo indica é também a que apresenta maior diversidade endofítica tanto de bactérias como de fungos. O estudo das comunidades endofíticas tem aumentado substancialmente nos últimos 30 anos, pois foi verificado que esses microrganismos apresentam importante papel no desenvolvimento da planta hospedeira (Araújo *et al.*, 2010).

2.2. Fungos Endofíticos

Calcula-se que existam, aproximadamente, 400.000 espécies de plantas e cada uma delas pode abrigar pelo menos entre três a seis espécies de fungos endofíticos. Com isso, a estimativa do número total desses microrganismos ao nível mundial é de 1 milhão de espécies fúngicas (Strobel *et al.*, 2004). Considerando a alta diversidade desses fungos associada ao clima tropical, a proporção sugerida para o número total de espécies seria de 33 para cada vegetal, compreendendo cerca de 8.250.000 espécies (Arnold *et al.*, 2000; Hawksworth, 2000; Gamboa *et al.*, 2002). Um levantamento feito por Schulz e Boyle (2005) mostrou que na década de 90, mais de 6.500 fungos endofíticos haviam sido isolados de cerca de 500 plantas. O número de espécies pode variar de acordo com a espécie do hospedeiro, distribuição geográfica, tecido vegetal onde o fungo se instala (folha, caule, raiz, flor, semente), idade do vegetal, altitude, umidade, precipitação anual, entre outros fatores (Carroll, 1988; Kumaresan e Suryanaraynan, 2001; Strobel e Daisy, 2003; Oki *et al.*, 2007; Nascimento, 2009; Vieira *et al.*, 2011). Até o presente os fungos endofíticos foram encontrados em todas as plantas estudadas: algas (Hawksworth, 1998), briófitas (Schulz *et al.*, 1993), pteridófitas (Fisher, 1996), coníferas (Legault *et al.*, 1989), arbustos (Petrini *et al.*, 1992b) e árvores em geral (Faeth e Hammon, 1997).

Rodriguez e Redman (2008) categorizam os fungos endofíticos como patógenos, sapróbios ou mutualistas, apoiando a questão que isolados da mesma espécie ou gênero podem apresentar uma plasticidade ecológica significativa. Análises indicam que a expressão do comportamento depende do genótipo do hospedeiro. Tal hipótese foi exemplificada por estudos que demonstram que espécies de *Colletotrichum* classificadas como patogênicas para algumas plantas (*Colletotrichum magna* do Melão; *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* do Morango), em outros hospedeiros (*C. magna* do tomate; *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* do Melão), além de não causarem doenças, estabelecem uma relação mutualística como: resistência a doenças, promoção de crescimento e/ou tolerância à seca.

Atribuem-se outras características importantes aos fungos endofíticos, as quais têm despertado interesse quanto ao seu potencial biotecnológico, econômico e ecológico. Por produzirem metabólitos que podem ser neutros ou terem ação antagônica para o hospedeiro ou também podendo apresentar utilidades na área médica, agrícola ou industrial. Novos antibióticos, antivirais, imunossuppressores, antitumorais, antidiabéticos, antioxidantes,

antimicrobianos, antineoplásicos, antiherbicidas, antihelmínticos, inseticidas e cosméticos são alguns exemplos da capacidade de produção destes fungos (Azevedo *et al.*, 2000; Tan e Zou, 2001; Schulz *et al.*, 2002; Strobel *et al.*, 2002; Esposito e Azevedo, 2004; Strobel *et al.*, 2004; Gunatilaka, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

2.2.1. Interação Ecológica entre Fungos Endofíticos e Plantas Hospedeiras

Devido à associação entre os endofíticos e espécies vegetais, tem sido sugerido que estes microrganismos co-evoluíram com seus hospedeiros (Misagui e Donndelinger, 1990), apresentando uma íntima interação mutualística, onde os endofíticos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira e a mesma também encontra vantagens decorrentes dessa interação, o que promoveu adaptação destas espécies vegetais frente a condições adversas do ambiente como estresse intenso causado por fatores abióticos (temperatura, umidade, luz, solos ácidos, entre outros) ou bióticos (ataque de insetos, outros microrganismos e animais herbívoros, por meio da produção de vários compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos a seus inimigos) (Hallmann *et al.*, 1997; M'Piga *et al.*, 1997; Schardl e Phillips, 1997; Saikkonen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2006; Senthilkumar *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2008). Além de ajudar no aumento do crescimento vegetal, pela produção de compostos que facilitam a entrada e a utilização de nutrientes disponíveis no ambiente, ou pela síntese de reguladores vegetais como as giberelinas, auxinas, citoquininas e o etileno (Hallmann *et al.*, 1997; Bent e Chanway, 1998; Shishido *et al.*, 1999; Tsavkelova *et al.*, 2007; Barrow *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2010), os fungos endofíticos podem também estimular e induzir a produção e germinação de sementes (Freyermuth *et al.*, 1996; Holland, 1997).

A relação que se estabelece é complexa e depende de vários fatores, como características do vegetal, do microrganismo e do ambiente (Owen e Humdley, 2004), e é bastante questionada, existindo duas principais hipóteses: a do equilíbrio antagônico e da simbiose mutualística (Faeth, 2002; Selosse *et al.*, 2004; Rudgers, 2004; Saikkonen *et al.*, 2004; Müller e Krauss, 2005; Schulz e Boyle, 2005; Kogel *et al.*, 2006; Maheshwari, 2006). Essa complexidade tem direcionado os estudos com endofíticos não só para os focos tradicionais, como controle biológico de pragas e doenças e promoção de crescimento vegetal, como, também para a investigação de padrões de colonização, forma de penetração e transferência desses microrganismos nas plantas (Araújo *et al.*, 2010).

Os mecanismos de colonização dos tecidos dos vegetais por fungos endofíticos, segundo Petrini (1991) ocorrem de duas formas: horizontalmente e/ou verticalmente. A primeira consiste na transmissão do fungo por meio de esporos de origem assexual e sexual. Nesse caso, ocorre a penetração do fungo por aberturas naturais, tais como estômatos e hidatódios presentes nas partes aéreas da planta (folhas, caules, cotilédones, flores e frutos), ativamente pela secreção de enzimas que degradam a parede celular das células vegetais ou utilizando apressórios e haustórios, por aberturas artificiais como fissuras sofridas pela ação de insetos e outros animais, homem e agressões abióticas e ou ainda por secreção de enzimas hidrolíticas (Esposito e Azevedo, 2010). No segundo tipo de transmissão (vertical) o fungo é difundido sistemicamente entre gerações da planta hospedeira ao penetrarem as sementes ou através da zona radicular quando há ferimentos causados pela abrasão das raízes com o solo durante o crescimento (Saikkonen *et al.*, 2004; Marinho *et al.*, 2005; Johri, 2006).

Dentro da planta, os fungos endofíticos podem permanecer próximos ao local de entrada ou se disseminarem pelo sistema vascular. Portanto, a colonização pode ser intracelular e limitada a poucas células, intercelular e localizada ou ainda inter e intracelular sistêmica e pode se desenvolver em qualquer tecido ou órgão do vegetal (Bacon e White, 2000; Zinniel *et al.*, 2002; Peixoto-Neto *et al.*, 2002; Schulz e Boyle, 2005; Marinho *et al.*, 2005; Johri, 2006). A relação bioquímica e a produção de metabólitos (primários e secundários) entre endofíticos e suas plantas hospedeiras ainda não estão totalmente esclarecidas (Owen e Hundley, 2004; Rosenblueth e Martinez-Romero, 2006).

As comunidades endofíticas cuja composição, forma de colonização e transmissão em função da planta hospedeira e das condições ambientais, se inter-relacionam em um balanço harmônico (Peixoto-Neto *et al.*, 2002). Considerando essas três variáveis os fungos endofíticos são divididos, artificialmente, em dois grupos ecológicos: balansiaceous, que colonizam especificamente gramíneas e não-balansiaceous (Schulz e Boyle, 2005). O primeiro grupo é constituído por espécies de *Epichloe* e *Balansia* (anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*) que se desenvolvem de forma sistêmica e intercelular em todos os órgãos de gramíneas e são transmitidos verticalmente através de sementes (Bacon e White, 2000). Devido a sua importância ecológica, os balansiaceous são os mais estudados por apresentarem estruturas especializadas na absorção de nutrientes e por produzirem uma variedade de metabólitos secundários como alcalóides tóxicos a insetos e

vertebrados. Por conta disso, a relação ecológica entre os fungos balansiaceos e seus hospedeiros é considerada mutualística, onde o fungo encontra nutrientes e proteção contra estresses abióticos e a planta por sua vez é protegida contra a herbivoria. (Saikkonen *et al.*, 1998; Schardl, 2000; White *et al.*, 2000; Saikkonen *et al.*, 2004; Schulz e Boyle, 2005).

O segundo grupo, não-balansiaceos, é diversificado e constituído, principalmente, por diferentes espécies do filo Ascomycota, são encontrados em todos os órgãos de praticamente todas as plantas terrestres estudadas (Petrini, 1991; Stone *et al.*, 2004; Schulz e Boyle, 2005), compreendendo frequentemente os ascomicetos que produzem ascotromas (Loculoascomicetes) e os que produzem peritécios (Pirenomicetes) (Alexopoulos *et al.*, 1996). A colonização deste grupo pode ser inter ou intracelular, sistêmica ou localizada (Schulz e Boyle, 2005). Podem ocorrer em ambientes temperados e tropicais, sendo os gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma* e *Pleospora*, frequentemente isolados de uma gama de hospedeiros (Azevedo *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2000; Schulz e Boyle, 2005; Pimentel *et al.*, 2006; Siqueira *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2011).

Neste sentido, as florestas tropicais são consideradas ecossistemas com maior biodiversidade quando comparadas às florestas temperadas e esta diversidade biológica implica em diversidade química, pois no contexto da corrida evolucionária, sobrevive o organismo capaz de estar em constante inovação química (Bills, 2002). De fato, os mesmos autores mostram que fungos endofíticos de ambientes tropicais, fornecem um maior número de produtos naturais, além disso, notaram que é significativamente elevado o número destes microrganismos produzindo diversos metabólitos secundários ativos, se comparado com os fungos de florestas temperadas. Esta observação sugere a importância do ambiente em que a planta hospedeira está inserida sobre o metabolismo dos endofíticos.

2.2.2. Ocorrência de Fungos Endofíticos em Plantas Medicinais

Certos vegetais produzem fármacos e devido a essa capacidade são considerados como plantas de uso medicinal. Na verdade, segundo Araújo *et al.* (2010) estes vegetais podem possuir fungos endofíticos que também sintetizam estes compostos com propriedades medicinais, o que pode ser explicado por transferência horizontal dos genes durante a longa convivência entre endofítico e planta hospedeira.

Por colonizarem um nicho ecológico muito específico, onde microrganismo e seu hospedeiro estão sujeitos a constantes e singulares interações, alguns fungos endofíticos encontrados em plantas medicinais ou com propriedades terapêuticas demonstram a capacidade de produzirem metabólitos naturais bioativos envolvidos nessa relação endofítico-hospedeiro, com atividade biológica idêntica ou semelhante à planta que colonizam. Os metabólitos podem inibir uma ampla variedade de agentes causadores de doenças, incluindo fungos fitopatogênicos (Azevedo, 1998; Pilleggi *et al.*, 2002; Strobel, 2003; Puri *et al.*, 2005; Eyberger *et al.*, 2006; Kusari *et al.*, 2008), além de apresentarem ação antibacteriana, antifúngica e antitumoral (Wagenaar *et al.*, 2000; Strobel *et al.*, 2004) e atuarem como agentes antidiabéticos e imunossupressivos (Zhang *et al.*, 1999). Nesse sentido plantas medicinais se destacam como fortes candidatas a investigação do potencial biológico dos seus fungos endofíticos, diante da imensa diversidade vegetal existente em todo mundo (Strobel, 2003).

Rodrigues *et al.* (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*.

Gao *et al.* (2005) avaliaram a composição de fungos endofíticos da planta medicinal *Heterosmilax japonica*, reconhecida na China por seus efeitos diuréticos, por meio de análises moleculares de RFLP e ITS de rDNA. Os autores observaram vários gêneros de fungos colonizando o interior deste vegetal, entre eles *Mycosphaerella*, *Phomopsis*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Glomerella*, *Botryosphaeria* e *Guignardia*. Também 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*.

Huang *et al.* (2008) isolaram 1.160 fungos endofíticos de 29 espécies de plantas medicinais e investigaram a taxa de colonização, a frequência relativa e a relação entre a presença destes microrganismos e os componentes químicos das plantas. Os resultados mostraram que a comunidade fúngica endofítica é bastante diversa e apresentam especificidade de hospedeiro e tecido. Os gêneros mais frequentes foram *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Xylaria*. Os autores deste estudo sugerem que a medicina tradicional, utilizando plantas, é uma rica e viável fonte de novos fungos

endofíticos. Eles sugerem, ainda, que estudos sobre os componentes químicos das plantas hospedeiras são importantes para o entendimento da relação endofítico-hospedeiro.

2.2.3. Atividade Antimicrobiana de Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos são conhecidos por produzirem substâncias de grande relevância capazes de inibir ou matar uma variedade de agentes causadores de doenças, bem como bactérias e fungos que afetam a população humana, os animais e as plantas (Demain, 1999). Dessa forma, fungos endofíticos obtidos de plantas medicinais têm sido reconhecidamente alvo de isolamento, caracterização e análise por apresentarem grande potencial para exploração e descoberta de novas moléculas bioativas (Kumar e Hyde, 2004; Tejesvi *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Kusari *et al.*, 2009; Aly *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2011). Estas substâncias, por sua vez, podem ser altamente tóxicas, como as micotoxinas, ou ser bastante úteis por serem utilizadas como fármacos para tratamento de várias patologias. Esta dicotomia de funções é consequência da grande diversidade de compostos químicos que os fungos produzem (Pinto *et al.*, 2002).

Além disso, os fungos endofíticos têm sido usados em estratégias de controle biológico de fungos fitopatogênicos, pois por habitarem o mesmo nicho ecológico competem por nutrientes, produzem substâncias antibióticas, parasitam o patógeno ou mesmo induzem a planta a desenvolver resistência a doenças, regulando assim a população destes microrganismos (Azevedo *et al.*, 2002; Peixoto-Neto *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2003). E um dos pontos centrais para o biocontrole ser efetivo é a seleção de um antagonista, pois as chances de sucesso nos programas de controle biológico estão no isolamento e na seleção de microrganismos antagonistas eficientes (Ghini e Kimati, 1989; Bowers *et al.*, 2001). O uso de endofíticos no controle biológico de doenças em plantas é relatado por Azevedo *et al.* (2002), que destacam o uso de isolados considerados avirulentos ou hipovirulentos do patógeno, como no caso da murcha do tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* controlada por isolados endofíticos dessa mesma espécie.

Araújo *et al.* (2010) afirmam que em certos casos, efeitos sinérgicos entre plantas e microrganismos endofíticos acentuam o poder medicinal dessas plantas. Estudos desenvolvidos por Stierle *et al.* (1993) mostraram que o fungo *Taxomyces andreanae* encontrado na planta *Taxus brevifolia* produz um diterpeno denominado taxol que é também produzido pelo vegetal. O taxol é um poderoso antitumoral empregado no

combate ao câncer, especialmente de ovário e mama. O fungo *Pestalotiopsis microspora* encontrado na planta *T. wallaquiana* também produz taxol (Strobel *et al.*, 1996).

Zou *et al.*, 2000 isolaram o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* da planta medicinal chinesa *Artemisia mongolia* com grande resistência contra herbívoros, fungos e bactérias fitopatogênicas. Deste fungo foi obtido o ácido coletótrico com forte atividade contra algumas bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*) e contra o fungo fitopatogênico *Helminthosporium sativum*.

Castillo *et al.* (2002) isolaram e caracterizaram um novo antibiótico chamado munumbicina, produzido por uma linhagem endofítica, denominada *Streptomyces* NRRL 30562, isolada da planta medicinal *Kennedia nigriscans*, nativa da Austrália. O extrato do endofítico, obtido com solvente orgânico, foi purificado e submetido à 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* multiresistente. A munumbicina B inibiu *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), enquanto a munumbicina D apresentou atividade contra o parasita da malária *Plasmodium falciparum*. O extrato da linhagem de *Streptomyces* foi testado ainda contra vários patógenos de plantas, apresentando atividade contra *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erwinia carotovora*, *Cochliobolus carbonum* e *Penicillium* sp., mostrando o grande potencial destas novas substâncias para a medicina e agricultura.

Huang *et al.* (2007) investigaram a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos da planta medicinal *Nerium oleander* L. e estes apresentaram bons resultados contra bactérias e fungos patogênicos. O líquido fermentado, filtrado e diluído da cultura de sete fungos endofíticos apresentou eficácia contra os microrganismos teste. Entre os isolados a amostra NoS16 inibiu *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* com as concentrações mínimas inibitórias.

Artemisia annua, planta medicinal que é conhecida por produzir um composto antifúngico denominado artemísia, que protege as plantas contra fungos fitopatogênicos (Liu *et al.*, 2001). Estes autores verificaram que 21 fungos endofíticos isolados desta planta possuem atividade antagônica contra os fungos fitopatogênicos: *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium graminearum*, *Gerlachia nivalis* e *Phytophthora capsici*, sugerindo que a defesa da planta

seria, decorrente da presença destes microrganismos. Lu *et al.* (2000) identificaram três novos metabólitos do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. isolado de *A. annua* com propriedades antimicrobianas.

Li *et al.* (2005) verificaram a capacidade antagônica de fungos endofíticos de 12 plantas chinesas contra fungos fitopatogênicos (*Aspergillus niger*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *Phytophthora nicotianae*, *Scopulariopsis* sp., *Trichoderma viride* e *Verticillium* sp.), e Lin *et al.* (2007) avaliaram os endofíticos da planta medicinal *Camptotheca acuminata* contra bactérias (*B. subtilis*, *Escherichia coli* e *S. aureus*) e fungos (*Candida albicans* e *A. niger*) patogênicos ao homem. Em ambas as pesquisas os resultados dos testes de bioatividade mostraram que aproximadamente 30% dos isolados mostraram atividade antimicrobiana contra pelo menos um microrganismo teste.

Strobel (2003) e Strobel *et al.* (2004) apresentaram outras substâncias importantes produzidas por fungos endofíticos: criptocandina A, criptocina, pestalósido e jesterona. A criptocandina A é um antifúngico lipopeptídico obtido do fungo *Cryptosporiopsis quercina* isolado da planta medicinal *Tripterigeum wilfordii*. Este composto é ativo contra fungos importantes por causarem patologias ao homem, incluindo *C. albicans* e *Trichophyton* sp. e também frente a fungos fitopatogênicos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*. A criptocina, um ácido tetrâmico, com atividade antifúngica também já foi isolado de *C. quercina* e pestalósido e jesterona ambos com propriedades antifúngicas e produzidos por fungos do gênero *Pestalotiopsis*, endofítico comumente encontrado em plantas tropicais.

Alguns outros fármacos produzidos por fungos endofíticos são a leucinostatina A, antitumoral e antifúngico produzido por *Acremonium* sp.. Estes microrganismos também sintetizam antimicrobianos de importância na área de sanidade vegetal e animal, inclusive humana. É o caso do fungo *Chloridium* sp. que produz ajavanicina, que é um antibacteriano contra *Pseudomonas* (Araújo *et al.*, 2010).

Muscodor albus, uma nova espécie de fungo endofítico isolado da planta popularmente conhecida como pau-canela (*Cinnamomum zeilanicum*), demonstrou ser capaz de inibir e matar outros fungos e bactérias pela produção de cinco diferentes tipos de metabólitos voláteis (Strobel, 2003).

Peláez *et al.* (1998) isolaram fungos endofíticos de plantas medicinais, na Espanha, e 27% das espécies produziram compostos antimicrobianos.

Rodrigues *et al.* (2000) pesquisaram compostos bioativos, produzidos por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Spondias mombin* L. e verificaram que *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii*, ao serem avaliados contra actinomicetos, bactérias, leveduras e fungos filamentosos, causaram inibição no crescimento de todos os microrganismos testados.

Huang *et al.* (2001) testaram a atividade antitumoral e antifúngica de fungos endofíticos das plantas medicinais *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandis*, na China e constataram que 52,3% dos isolados inibiram o crescimento de *Fusarium* sp. e *Paecilomyces* sp.

No Brasil vários autores citam a produção de fármacos por fungos endofíticos como *Xylaria* sp., *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e *Phomopsis* sp. (Gomes, 2008).

A continuidade dos estudos sobre novos agentes antimicrobianos é importante para superar as dificuldades relatadas sobre o tratamento de infecções causadas por patógenos resistentes (Petersen *et al.*, 2004), e os fungos endofíticos têm emergido como uma fonte alternativa para a produção de novos compostos antimicrobianos (Pupo *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2008).

2.3. *Equisetum arvense* L.

2.3.1. Características Gerais

Originária da Europa, *Equisetum arvense* (Figura 1) popularmente conhecida como cavalinha, é uma planta pertencente à classe Articulatae, ordem Equisetales e família Equisetaceae, considerada um fóssil vivo datando do fim do período Paleozóico, no Carbonífero Superior (300 milhões de anos atrás) (Ferreira, 2001). O único gênero vivo de toda classe, *Equisetum*, é extremamente variável em sua morfologia principalmente as plantas híbridas (Veit *et al.*, 1994), incluindo aproximadamente 25 espécies em todo o mundo, entre as quais destacam-se *E. palustre*, *E. telmateia*, *E. pratense*, *E. sylvaticum*, *E. fluvatile*, *E. bogotense* e *E. arvense*. É um arbusto bastante presente e sua distribuição se dá por todo Hemisfério Norte (D'Agostino *et al.*, 1984; Radulovic *et al.*, 2006). Podem ser encontradas em toda Europa e nas ilhas Britânicas, bem como, na América do Norte (do Alasca até o sul da Califórnia), Central e do Sul (Mitich, 1992; Santos *et al.*, 2005). No Brasil podem ser encontradas em toda região centro-oeste e em Minas Gerais, onde

ocorrem como uma espécie cujo caule delgado apoia-se sobre outras plantas, podendo atingir até 12 m de comprimento (Corrêa, 1984).

O nome de *E. arvense*, o qual Carolus Linnaeus (1707-1778) inseriu em seu *Species Plantarum* em 1753 (Mitich, 1992), é derivado do latim *equi* = cavalo, *setum* = cauda ou rabo (Teske e Trentini, 1995). Daí o seu nome e outras designações como rabo-de-cavalo, cavalinha-dos-campos, lixa-vegetal e erva-carnuda (Forès, 2004). São plantas perenes que preferem regiões úmidas (geralmente ocorrem nas margens de lagos e rios) e solos ricos em minerais, e se reproduzem por esporos e por rizomas tubulares (por baixo da superfície do solo). Possuem caules ocos, cilíndricos que emitem talos aéreos de cor verde-acinzentados, desprovidos de folhas, flores e sementes. São constituídas de nós e entrenós, de textura rugosa e cor marrom clara, com pontas amareladas em forma de lança, onde se encontram uma estrutura de reprodução, denominada de estróbilo, onde se dá a produção de esporos, os quais sendo esféricos apresentam “quatro braços” que se estendem para que, tal como velas, possam ser transportados pelo vento e, uma vez no solo, recolhem-se para lá ficar se o solo for fértil ou, caso contrário, voltarem a estender-se (Aleixo, 1995; Franco, 2001; Forès, 2004; Santos *et al.*, 2005). Podem atingir de 10 a 25 cm de altura, raramente atingem 1 m de altura (Mitich, 1992). A maior espécie se encontra nos bosques úmidos da América do Sul, *E. giganteum*, capaz de subir pelas árvores até atingir vários metros de altura (Forès, 2004).



Figura 1. *Equisetum arvense* L.

Fonte: <http://escolaambiente.faccat.br/cavalinha.html>

E. arvense apresenta bainha dentada caliciforme, presa pela base ao nó do caule. Desta bainha partem ramificações verticiladas e articuladas. Os ramos férteis aparecem

numa determinada época do ano para cada espécie, onde os estemas com os esporos são seguidos por ramos verdes em forma de pluma com 10 a 50 cm de comprimento, se assemelhando a um rabo de cavalo (Cemtchujnicov, 1976). As raízes da cavalinha têm uma grande capacidade de retirar nutrientes do solo, inclusive metais como ouro e quantidades significantes de cobalto, cálcio e sílica, aos quais é atribuída a atividade fungicida (Mitich, 1992).

Esta espécie é conhecida como umas das plantas com maior acúmulo de silício (sílica biogênica) (Sapei *et al.*, 2007). Os investigadores acreditam que as propriedades medicinais antibacterianas e antisépticas associadas à planta são devidas ao elevado teor deste componente. A sílica, termo que se refere aos compostos de dióxido de silício (SiO_2) é depositada nos caules sob a forma de uma fina camada superficial (Rico *et al.*, 2000). Além disso, possui em sua composição mais de 10% de constituintes inorgânicos (sendo que, dois terços são o ácido silícico e sais de potássio). Também apresenta magnésio, cálcio, fósforo, sódio, flúor, enxofre, manganês e alumínio. (D'Agostino *et al.*, 1984; Franco, 2001), e compostos fenólicos, flavonóides (isoquercitina, campferol), ácidos orgânicos, resina, alcalóides (nicotina, equispermina, palustrina), tiaminase, dimetilsufona, esteróides (β -sitosterol, campesterol, isofucoesterol), vitamina C e fitosterol (Wichtl, 1994; Franco, 2001; Santos *et al.*, 2005). A presença de flavonóides revela a existência de dois quimiotipos de *E. arvense*, uma ocorrendo na Ásia e América do Norte e outro na Europa (Nagai *et al.*, 2004).

A cavalinha é uma planta remineralizante, outrora utilizada para o restabelecimento dos doentes com tuberculose. Alguns dos ácidos (péctico e gálico) produzidos por esta planta são úteis para estancar as hemorragias (Forès, 2004; Nagai *et al.*, 2004). Também, atua como depurativa, diurética, cicatrizante, combate problemas de pele, do tecido conjuntivo, rugas, estrias, úlceras varicosas, eczema, acne, unhas frágeis, celulite, flacidez, edemas, gota. É desintoxicante, podendo ser utilizada em cortes, contusões, ferimentos e disenterias. É também adstringente e anticancerígena. Apresenta bom resultado nos casos de arteriosclerose, osteoporose, artrose, descalcificação óssea, raquitismo, reumatismo, doenças urinárias, gastrite, anemia, além de consolidação de fraturas dos ossos, devido à ação adstringente do ácido monossilícico (Franco, 2001). É utilizada na Europa como abrasiva e polidor de metais devido à presença de sílica (Mitich, 1992; Lemus *et al.*, 1996). Atualmente sua utilização é bastante diversificada e segue desde o uso em infusões de

caráter terapêutico até a participação em diversas fórmulas de medicamentos alopáticos (Ferreira, 2001).

2.3.2. Fungos Endofíticos Associados à *Equisetum arvense*

Ainda não há na literatura brasileira dados de estudos da micobiota endofítica de *E. arvense*. Recentemente, foram realizados alguns estudos relacionados às comunidades endofíticas de plantas marinhas e halófitas (Cornick *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008; Maciá-Vicente *et al.*, 2008). No entanto, houve poucas pesquisas sobre comunidades de fungos endofíticos de plantas aquáticas/ribeirinhas (Sridhar e Bärlocher, 1992; Sati e Belwal, 2005).

Até o momento apenas dois trabalhos sobre a composição de fungos endofíticos de *E. arvense* foram publicados. Um deles foi realizado na Índia por Sati e Belwal (2005) que isolaram hyphomycetes aquáticos como endofíticos de raízes de plantas ribeirinhas de dois riachos em Kumaun Himalaia na Índia, dentre as quais o gênero *Equisetum* foi avaliado. Neste trabalho, os autores observaram que a frequência máxima de ocorrência desses microrganismos foi nos meses de novembro e dezembro, quando as temperaturas foram mais baixas e das 18 espécies isoladas quatro foram obtidas de *Equisetum* (*Alatospora acuminata*, *Anguillospora crassa*, *Pestalotiopsis submersus* e *Tetracladium setigerum*), sendo as três primeiras relatadas pela primeira vez como endofíticas e a última já havia sido isolada de raízes do morangueiro.

O outro trabalho tratou de um levantamento sobre a composição da comunidade endofítica de cinco plantas, sendo três aquáticas (que vivem submersas) e duas ribeirinhas (que ocorrem ao lado do córrego e parte do seu tronco fica na água) na província de Yunnan, sudoeste da China onde o clima é temperado. *E. arvense* foi uma dessas últimas, e foi a que apresentou maior taxa de colonização e maior número de táxons, correspondendo a 63% e 16, respectivamente. Dos 214 fungos endofíticos isolados, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Geotrichum* foram os gêneros dominantes (Li *et al.*, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do Material Vegetal

Foram realizadas duas coletas da planta *E. arvense* na horta medicinal do setor de fitoterápicos do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) em Recife-PE (07°52'47,2"S; 038°06'17.1"W) (Figura 2), sendo uma durante o período chuvoso (mês de julho) (coleta 1) e a outra durante o período de estiagem (mês de outubro) (coleta 2) do ano de 2010. Os dados de precipitação pluviométrica e de temperaturas máxima e mínima da área de cultivo da referida planta, nos períodos de coleta constam na tabela 1.

Em cada coleta foram escolhidas aleatoriamente seis amostras de *E. arvense*. Essas plantas foram colhidas inteiras, ao longo das coletas, acondicionadas em sacolas plásticas identificadas com etiquetas e conduzidas ao Laboratório de Fungos Fitopatogênicos do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (Recife-PE, Brasil), onde caules e raízes aparentemente sadios, ou seja, sem manchas ou qualquer tipo de lesão causada por patógenos, insetos ou ação mecânica foram separados individualmente e lavados em água corrente para retirar resíduos de poeira e solo.



Figura 2. Horta medicinal do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).

Tabela 1. Precipitação pluviométrica e temperaturas máxima e mínima no município de Recife, Pernambuco

Coleta (mês/ano)	Período	Precipitação Pluviométrica (mm)	Temperatura (°C)	
			Máxima	Mínima
Julho/2010	Chuvoso	56,5	32,0	17,9
Outubro/2010	Estiagem	28,0	33,0	21,0

Fonte: Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA); Sistema de Monitoramento Agrometeorológico (Agritempo).

3.2. Desinfestação das Amostras e Isolamento dos Fungos Endofíticos

A desinfestação superficial, para eliminação dos microrganismos epifíticos, das amostras teciduais da planta *E. arvense* foram conduzidas de acordo com Araújo *et al.* (2005). Após a lavagem em água corrente as amostras foram submetidas, em câmara asséptica, a uma sequência de imersões: em solução de álcool etílico a 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 4 minutos, novamente em etanol (70%) por 30 segundos e lavadas duas vezes em água destilada esterilizada por 1 minuto, por fim as amostras foram colocadas para secar em papel de filtro esterilizado. O controle da eficiência do processo de desinfestação foi confirmado através da semeadura de alíquotas (1mL) da última água da lavagem em placas de Petri com o mesmo meio de cultura utilizado no isolamento dos fungos.

Após a desinfestação, com o auxílio de um bisturi esterilizado, foram retirados seis fragmentos (0,5 cm² aproximadamente) dos tecidos vegetais por planta coletada, os quais foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, pH 6,8; contendo 200g de batata; 20g de dextrose e 15g de ágar para 1000mL de água destilada; autoclavado por 15 min a 120°C; Lacaz *et al.*, 2002) suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) para suprimir o crescimento de bactérias. Foram utilizadas, para cada uma das seis amostras de cada coleta, dez repetições com seis fragmentos de caule e dez repetições com seis fragmentos de raiz, totalizando 1440 fragmentos (720 de caule e 720 de raiz). As placas foram incubadas em temperatura ambiente (25±2°C) por até trinta dias. O crescimento das colônias fúngicas foi

acompanhado diariamente e na medida em que surgiam eram repicadas, purificadas e preservadas em tubos contendo meio BDA para posterior identificação.

3.3. Identificação dos Fungos Endofíticos

A identificação dos fungos foi realizada na Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil. Foram observadas características macroscópicas das colônias (coloração, aspecto, textura, consistência, presença de pigmentos, diâmetro e bordas) a partir de cultivo em colônia central e microscópicas (morfologia das estruturas de resistência, reprodutivas e somáticas) a partir de lâminas preparadas com fragmentos de micélio e para maior riqueza de detalhes, foram também preparadas lâminas sob a forma de microcultivo e observadas sob microscópio óptico. Os fungos que não esporularam quando cultivados em BDA foram transferidos para os meios de cultura Ágar Extrato de Malte (EMA, pH entre 5 e 6; contendo 20g de extrato de malte, 1g de peptona, 20g de dextrose e 20g de ágar para 1000mL de água destilada; autoclavado por 15 min a 120°C) e V-8 (contendo 5g de tomate, aipo, beterraba, alface, cenoura, agrião, salsinha, espinafre e glicose para 1000mL de água destilada; autoclavado por 15 min a 120°C) a fim de induzir a esporulação. Os aspectos observados foram comparados com os descritos nas chaves taxonômicas de literaturas específicas (Booth, 1971; Ellis, 1971; Ellis, 1976; Sutton, 1980; Carmichael *et al.*, 1980; Barnett e Hunter, 1987; Domsch *et al.*, 1993; Hanlin, 2000).

3.4. Avaliação *in vitro* de Fungos Endofíticos com Ação Antagônica contra Fungos Fitopatogênicos

3.4.1. Fungos Endofíticos e Fitopatogênicos Utilizados

Foram utilizados nove isolados de fungos endofíticos (devido à escassez de experimentos de antagonismo com os mesmos) obtidos da planta medicinal *E. arvense* (*Curvularia lunata* var. *aeria*; *Curvularia pallescens*; *Curvularia brachyspora*; *Cladosporium oxysporum*; *Cladosporium cladosporioides*; *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium solani*; *Fusarium verticillioides* e *Gliomastix murorum* var. *felina*), pertencentes ao grupo dos Hyphomycetes e dois isolados de fungos

fitopatogênicos das espécies *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (URM 5283) e *Sclerotium rolfsii*. O primeiro foi fornecido pela Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco e o segundo foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Antônio Felix da Costa, o qual foi isolado a partir de um feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), na sede do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, em Recife PE, em fevereiro de 2010. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *S. rolfsii* destacam-se por causarem murcha de fusarium, murcha e podridão de esclerócio, respectivamente, em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), uma das principais hortaliças do mundo em termos de área de plantio e consumo (Ghini e Nakamura, 2001; Kawchuk *et al.*, 2001; Yaquib e Shahzad, 2005; Filgueira, 2005).

3.4.2. Análise da Velocidade do Crescimento Micelial dos Isolados

Para determinar a velocidade do crescimento micelial de cada isolado fúngico (endofíticos e fitopatogênicos), foram feitas inoculações individuais, transferindo-se discos de micélio-água de 4mm de diâmetro para o centro de placas de Petri invertidas, contendo meio BDA, com três repetições para cada isolado. A mensuração diária dos diâmetros das colônias, com o auxílio de uma régua milimetrada, foi realizada em dois sentidos ortogonais (vertical e horizontal) até o momento em que atingiram a borda da placa (Figura 3). A taxa de crescimento para cada uma das espécies foi obtida através da fórmula adaptada de Lilly e Barnett (1951), utilizando os dados de crescimento em dois intervalos de tempo: $T_{xc} = (C2 - C1) / (T2 - T1)$. Onde: T_{xc} = taxa de crescimento; $C1$ = crescimento no tempo 1; $C2$ = crescimento no tempo 2; $T1$ = tempo em que ocorreu a leitura 1; $T2$ = tempo em que ocorreu a leitura 2.

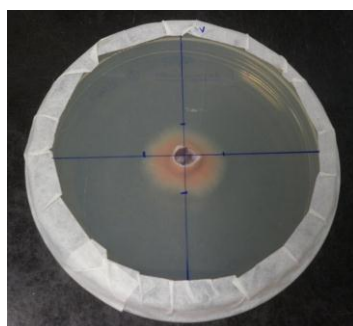


Figura 3. Medição do crescimento micelial em dois sentidos ortogonais.

3.4.3. Técnica de Cultura Pareada

Para determinar o potencial antagonístico dos fungos endofíticos isolados contra os fungos fitopatogênicos foi empregado o método de pareamento entre as culturas descrito por Dennis e Webster (1971). Em placas de Petri de 9cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA, foram depositados discos de micélio-água do antagonista e do fitopatogênico em pontos equidistantes, 7cm entre si e a 1cm da borda (Figura 4), considerando-se a taxa de crescimento de cada isolado, de tal forma que possibilitasse as colônias alcançarem simultaneamente o centro da placa.

Os isolados foram classificados quanto ao antagonismo segundo a escala de Bell *et al.* (1982), com as seguintes notas: 1 – Antagonista cresce e ocupa toda a placa, 2 – Antagonista cresce sobre uma parte do patógeno (2/3 da placa), 3 – Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum organismo domina o outro), 4 – Patógeno cresce sobre uma parte do antagonista (2/3 da placa) e 5 – Patógeno cresce e ocupa toda a placa. Para observação das interações entre os isolados foram colocadas lamínulas na região do ponto de encontro entre o antagonista e os fungos fitopatogênicos que posteriormente foram observadas sob microscopia óptica.

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 9 x 2, sendo nove fungos endofíticos utilizados no pareamento contra dois fungos fitopatogênicos, com três repetições.

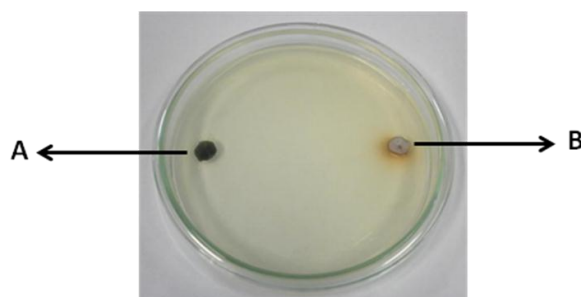


Figura 4. Distribuição dos discos de micélio-água dos fungos endofíticos (A) e fitopatogênicos (B), em meio BDA, para ensaio de antagonismo.

3.5. Atividade Antimicrobiana dos Fungos Endofíticos frente a Isolados de Importância Médica

Os fungos endofíticos foram submetidos ao ensaio antimicrobiano em meio sólido baseado na metodologia descrita por Ichikawa *et al.* (1971) a qual permite uma seleção rápida e qualitativa de microrganismos produtores de substâncias bioativas. Foram testados os mesmos fungos endofíticos citados no item 3.4.1. Os microrganismos teste foram obtidos da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA), sendo duas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538/ UFPEDA-02) e *Bacillus subtilis* (ATCC-6633/ UFPEDA-86), duas bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC-25922/UFPEDA-224) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC-29665/ UFPEDA-396) e uma levedura patogênica ao homem: *Candida albicans* (UFPEDA-1007).

Os fungos endofíticos utilizados na atividade antimicrobiana foram cultivados durante sete dias em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, incubadas em temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), de forma que o crescimento fosse em “tapete”. Após este período, com o auxílio de um furador previamente esterilizado foram retirados cilindros de 6mm de diâmetro dos fungos (micélio-ágar) e inoculados (de forma invertida) na superfície de placas Petri com meio Müeller-Hinton (pH entre 7,2 e 7,4; contendo 30g de infusão de carne bovina, 17,5g de peptona de caseína ácida, 1,5g de amido e 17g de ágar para 1000mL de água destilada; autoclavado por 15 min a 120°C) e BDA, previamente semeados com as bactérias e *C. albicans*, respectivamente. As placas de Petri foram incubadas por 24h a 37°C (as com bactérias) e a 30°C (as com levedura). Os halos de inibição foram medidos após este período. Como controle foi utilizado um cilindro apenas com meio BDA. Foram considerados negativos (-) quando não foi observado halo de inibição; +, os que apresentaram halos de até 10 mm; e ++, os que apresentaram halo de inibição maior do que 10 mm.

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 9 x 5, sendo nove fungos endofíticos utilizados no teste antimicrobiano e cinco microrganismos testes de importância médica, com três repetições.

3.6. Análise dos Dados

A taxa de colonização (TC) foi calculada pela razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico (N_f) e o número total de fragmentos (N_t) multiplicado por 100 ($TC = N_f / N_t \times 100$) (Araújo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008). A frequência relativa (FR) de isolamento foi calculada pelo número de isolados de uma espécie ou gênero dividido pelo total do número de isolados (Photita *et al.*, 2001). A densidade média dos fungos endofíticos nas duas coletas e no caule e raiz foram comparadas através do teste t para amostras independentes utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). As médias do crescimento micelial foram submetidas à análise de variância e depois foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software Assistat – Assistência Estatística (Silva, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fungos Endofíticos Isolados da Planta Medicinal *Equisetum arvense*

Um total de 235 isolados de fungos endofíticos filamentosos foram obtidos a partir dos 1440 fragmentos de tecidos vegetais (720 de caule e 720 de raiz) de *E. arvense* utilizados, sendo que 205 foram identificados aos níveis de gênero e espécie e 30 não puderam ser identificados por não terem apresentado estruturas reprodutivas, mesmo utilizando métodos alternativos para estimular a produção de esporos, sendo então agrupados como fungos não esporulantes. O processo de desinfestação utilizado foi eficiente, pois, não foi observado o aparecimento de colônias de fungos ou bactérias no plaqueamento das alíquotas da última água da sequência de lavagens.

Dos 22 taxa obtidos, 17 foram identificados ao nível de espécie e cinco ao nível de gênero. A Tabela 2 mostra esses dados e o respectivo valor da frequência relativa de isolamento de cada isolado. O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi o que apresentou maior frequência (25,11%). Esses dados corroboram os de Siqueira *et al.* (2011) que também isolaram *C. gloeosporioides* endofiticamente da planta medicinal *Lippia sidoides*, e o mesmo apresentou a maior frequência de isolamento (12,3%). O segundo fungo endofítico mais frequente foi *Fusarium oxysporum* (14,89%). A terceira maior frequência pertence aos fungos que não foram identificados, constituindo o grupo dos não esporulantes com 12,77% de frequência. Problemas na identificação de fungos endofíticos já foram observados por outros autores (Gamboa e Bayman, 2001). Petrini (1991) cita o tempo como fator importante na indução da esporulação, podendo os fungos esporularem dois, três ou até 14 meses depois do isolamento.

Os fungos menos frequentes foram *Fusarium lateritium*, *Gliomastix murorum* var. *felina*, *Pithomyces* sp., com frequência de colonização de 0,85% e *Chloridium* sp., *Curvularia brachyspora*, *Phialophora repens* e *Cladosporium cladosporioides* com 0,43% de frequência.

Tabela 2. Número total de isolados e frequência relativa de isolamento dos fungos endofíticos obtidos de caule e raiz da planta medicinal *Equisetum arvense* nas coletas.

Fungos Endofíticos	N	FR(%)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	59	25,11
<i>Fusarium oxysporum</i> E.F. Sm. & Swingle	35	14,89
Não esporulantes	30	12,77
<i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg	15	6,38
<i>Talaromyces</i> sp. C.R. Benj.	13	5,53
<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. & M.A. Curtis	11	4,68
<i>Fusarium solani</i> Sacc.	11	4,68
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> (Bat., J.A. Lima & C.T. Vasconc.) M.B. Ellis	8	3,40
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	6	2,55
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	6	2,55
<i>Phoma cava</i> Schulzer	6	2,55
<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw. & Hochapfel	6	2,55
<i>Phomopsis archeri</i> B. Sutton	6	2,55
<i>Xylaria</i> sp. Hill ex Grev.	6	2,55
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	4	1,70
<i>Sordaria</i> sp. Ces. & De Not.	3	1,28
<i>Fusarium lateritium</i> Nees	2	0,85
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>felina</i> (Marchal) S. Hughes	2	0,85
<i>Pithomyces</i> sp. Berk. & Broome	2	0,85
<i>Chloridium</i> sp. Link	1	0,43
<i>Curvularia brachyspora</i> Boedijn	1	0,43
<i>Phialophora repens</i> (R.W. Davidson) Conant	1	0,43
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1	0,43
Total	235	100,00

N= Número de fungos; FR(%)= Frequência relativa de colonização.

Colletotrichum é um gênero predominantemente isolado como endofítico de diferentes plantas (Pileggi, 2006), inclusive em plantas medicinais como *Artemisia annua*, *A. mongolica* e *Hertersmilax japonica* (Lu *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2005). Este gênero também foi o mais frequente em um trabalho realizado por Chen *et al.* (2011), apresentando 42,3% de frequência de colonização em fragmentos de caule, da folha e da raiz da planta medicinal *Huperzia serrata* e no estudo de Huang *et al.* (2008), onde verificaram 74,1% de frequência de *Colletotrichum* em *Artemisia lactiflora*, planta medicinal chinesa.

Colletotrichum gloeosporioides é considerado um patógeno mundial de plantas porque produz um composto fitotóxico que causa antracnoses, infectando muitas espécies de

plantas (Wang *et al.*, 2008). Entretanto, já foi isolado como endofítico de diversas plantas como bromeliáceas (Petrini e Dreyfuss, 1981), mangueira (Johnson *et al.*, 1992; Freire e Bezerra, 2001), palmeiras (Rodrigues e Samuels, 1999), cajueiro, aceroleira, mandioca, romanzeiro, umbuzeiro, mamoeira, carnaubeira (Freire e Bezerra, 2001), *Rhizophora* (Kumarasen e Suryanarayanan, 2001), *Citrus* (Araújo *et al.*, 2001; Durán *et al.*, 2005), *Musa* (Photita *et al.*, 2001), *Theobroma cacao* (Rubini *et al.*, 2005), além de cereais, legumes e vegetais (García-Pajón e Collado, 2003).

O gênero *Fusarium* apresenta espécies isoladas do solo e vegetais, também podem ser encontradas associadas a doenças em várias plantas hospedeiras (Mota e Gasparotto, 1998; Ventura e Costa, 2006). Peixoto-Neto *et al.* (2002) afirmaram que o endofítico pode vir a se comportar como um patógeno devido a redução dos mecanismos de defesa da planta hospedeira, comportando-se como patógenos latentes ou isolados hipovirulentos. Em vista disto eles consideram que a diferenciação entre as categorias ecológicas dos fungos endofíticos como patógenos, sapróbios ou mutualistas é de significado puramente didático já que a distância entre as condições pode ser muito estreita.

Os isolados dos 22 taxa foram distribuídos em três grupos: Hyphomycetes com 15 representantes, Coelomycetes com 4 e Ascomycetes com 3. Considerando esses dados foram obtidas as respectivas porcentagens de frequência de isolamento: 28,84%, 7,70% e 5,76% (Figura 5). Kharwar *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo, ao analisarem a planta medicinal *Adenocalymma alliaceum*, que apresentou 149 isolados de fungos endofíticos, dos quais 77,85% pertenciam ao grupo dos Hyphomycetes, 8,05% eram Ascomycetes, e 4,03% eram Coelomycetes, e 10,07% corresponderam aos fungos não identificados. Essa elevada frequência de isolamento dos fungos Hyphomycetes também foi verificada por Vieira *et al.* (2011) quando isolaram fungos endofíticos de algodão (*Gossypium* spp.), a qual foi de 73,90%. A maior frequência de distribuição de Hyphomycetes está de acordo com os dados verificados em outras plantas com propriedades medicinais como, *Melia azedarach*, *Terminalia arjuna*, *Aegle marmelos*, *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* (Santos *et al.* 2003; Tejesvi *et al.*, 2005; Gond *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2007; Kharwar *et al.*, 2010). Hyphomycetes como endofíticos são comuns em plantas de regiões de clima temperado e tropical (Bacon e White, 2000). Ao observarem a frequência dos grupos de fungos endofíticos, Siqueira *et al.* (2011) encontraram resultados diferentes aos do presente estudo, visto que o grupo dos Hyphomycetes foi o segundo mais frequente, representando

pouco mais de 25% dos isolados e Coelomycetes foi o grupo dominante com 45% de colonização em folhas e caules da planta medicinal *Lippia sidoides*.

Considerando o número de fragmentos utilizados a taxa de colonização foi de apenas 16,32%. Valor superior foi observado por Li *et al.* (2010), que ao analisarem a micobiota endofítica de *E. arvense* verificaram maior taxa de colonização de fungos endofíticos (63%), quando comparada com as outras quatro plantas avaliadas no mesmo estudo. Isso pode ser devido ao local de coleta (margens de um rio na província de Yunnan na China, onde o clima é temperado). Esse vegetal prefere locais úmidos, como as margens de rios e lagos de áreas de clima temperado ao contrário do observado em relação à planta utilizada neste estudo, que foi cultivada na cidade do Recife, onde o clima é tropical. Inúmeros fatores bióticos e abióticos estão envolvidos na penetração e colonização endofítica, entre eles a química e anatomia do tecido do hospedeiro e as condições ambientais a que o vegetal está exposto (Coley e Barone, 1996). Em plantas medicinais chinesas, Huang *et al.* (2008) também verificaram que os fungos endofíticos colonizaram de 36,7% a 100% dos fragmentos vegetais amostrados. Enquanto que Conti (2007), também em Recife, observou uma frequência total de apenas 23,3% de fungos endofíticos isolados de folhas da planta medicinal *Borreria verticillata*.

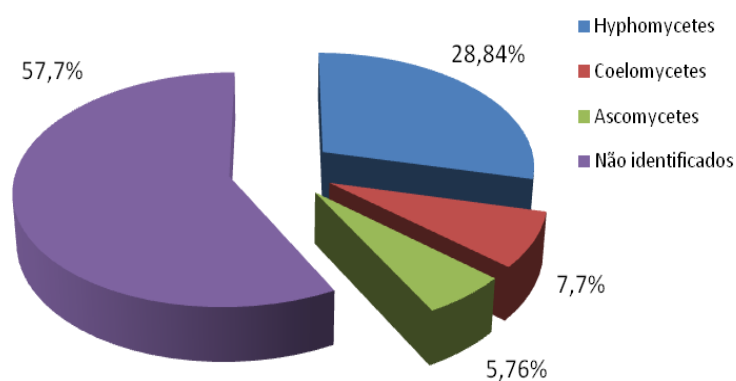


Figura 5. Frequência relativa de isolamento dos grupos de fungos endofíticos isolados de caule e de raiz de *Equisetum arvense* nas coletas.

Verificou-se um total de 14 gêneros de fungos endofíticos, *Fusarium* (26,8%) e *Colletotrichum* (25,1%) foram os mais frequentes. Estes resultados corroboram os estudos anteriores que demonstraram que espécies de *Fusarium* (Gond *et al.*, 2007; Kharwar *et al.*, 2008) e *Colletotrichum* (Larran *et al.*, 2001; Cannon e Simmons, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008) são frequentemente encontrados como dominantes na comunidade

endofítica em diferentes vegetais. Os demais gêneros foram: *Cladosporium* (7,65%), *Curvularia* (6,40%), *Talaromyces* (5,55%), *Phoma* (5,1%), *Phomopsis* e *Xylaria* (2,55%) *Nigrospora* (1,7%) *Sordaria* (1,3%), *Gliomastix* e *Pithomyces* (0,85%), *Chloridium* e *Phialophora* (0,42%) (Figura 6).

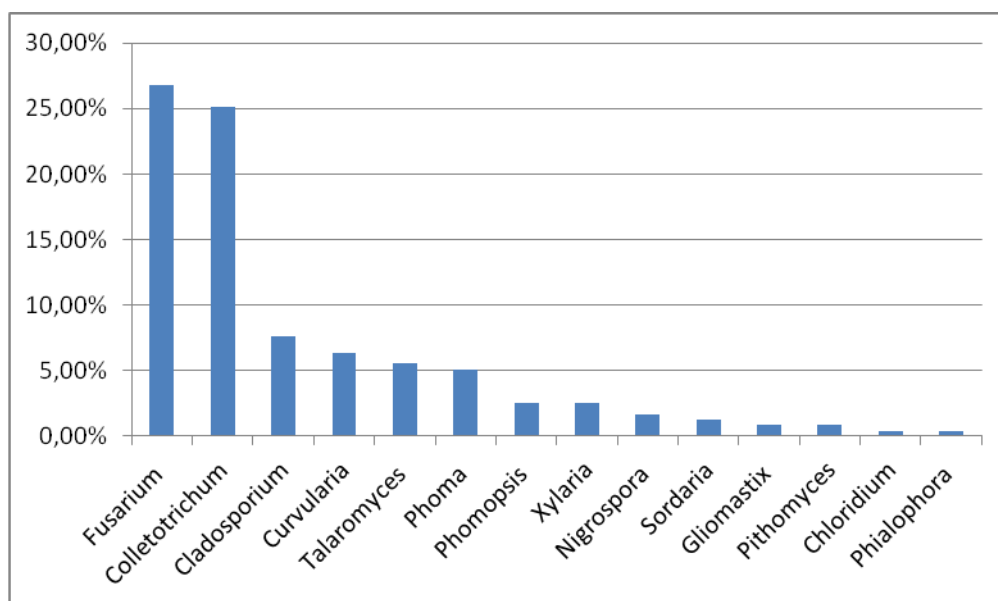


Figura 6. Frequência relativa de isolamento dos 14 gêneros de fungos endofíticos isolados de caule e de raiz de *Equisetum arvense* nas coletas.

Nos períodos de coleta analisados, foi observado que a densidade média de fungos endofíticos foi de 24% na primeira coleta, com um total de 144 isolados, e de 15,17% na segunda coleta, com um total de 91 isolados. O erro padrão para cada coleta foi de 8,58 e 2,56 respectivamente (Figura 7) e não houve diferença significativa ($t=2,41$; $p=0,06$) ao comparar a densidade de fungos endofíticos de cada amostra das coletas através do teste t.

Os resultados encontrados por Lima (2010) e Assunção (2010), diferem com os obtidos nesse trabalho, uma vez que foram encontradas frequências de colonização de fungos endofíticos de 53,77% em *Vitis labrusca* L. cv. Isabel e 59,7% em *Musa* spp., respectivamente, durante a estação chuvosa. A ocorrência de um maior número de fungos endofíticos na época chuvosa também foi observada em um estudo realizado por Pimentel *et al.* (2006), ao isolarem esses microrganismos em folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Em muitos casos, folhas analisadas durante o período chuvoso abrigaram mais fungos endofíticos do que aquelas observadas no período de estiagem (Wilson e Carroll, 1994; Suryanarayanan *et al.*, 1998).

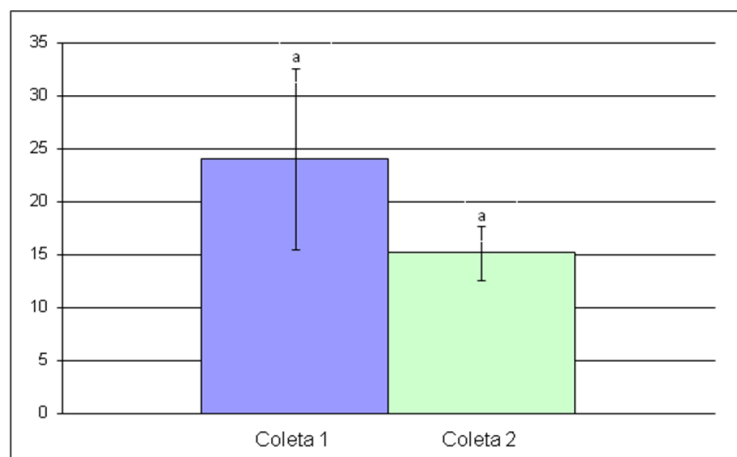


Figura 7. Densidade média ($\pm$ erro padrão) de fungos endofíticos isolados de *Equisetum arvense* nas coletas 1 (julho) e 2 (outubro) de 2010. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

No entanto, alguns autores obtiveram maior frequência de fungos endofíticos na estação de estiagem (Hallmann *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2005). Contudo, é importante reconhecer que essa variação na densidade de fungos endofíticos pode estar relacionada não só a diferença de estação, mas também a interação com outros microrganismos (patógenos e epifíticos) (Osono, 2007; Santamaria e Bayman, 2005), além de sofrerem influência do meio ambiente (Pimentel *et al.*, 2006; Unterseher *et al.*, 2007) e da idade do tecido vegetal (Photita *et al.*, 2001; Vujanovic e Brisson, 2002).

Em relação ao número de espécies encontradas nos dois períodos de coleta, não houve diferença significativa ($t=0,09$; $p=0,92$) através do teste t, visto que as médias foram de 7 e 6,83 para as coletas 1 e 2, respectivamente. A dinâmica da população de fungos endofíticos pode estar associada a algumas propriedades do hospedeiro como a composição química (Espinosa-Garcia e Langenheim, 1990) e a fisiologia (Lappalainen *et al.*, 1999). As condições ambientais também podem influenciar na composição da comunidade fúngica endofítica tanto no tempo como no espaço, bem como em diferenças sazonais (Kinkel, 1991; Collado *et al.*, 1999; Fryar *et al.*, 2004).

Colletotrichum gloeosporioides (19,31%) e *F. oxysporum* (17,93%) foram as espécies mais frequentes na coleta 1 (Figura 8). A frequência de fungos não identificados neste período foi de 17,24%.

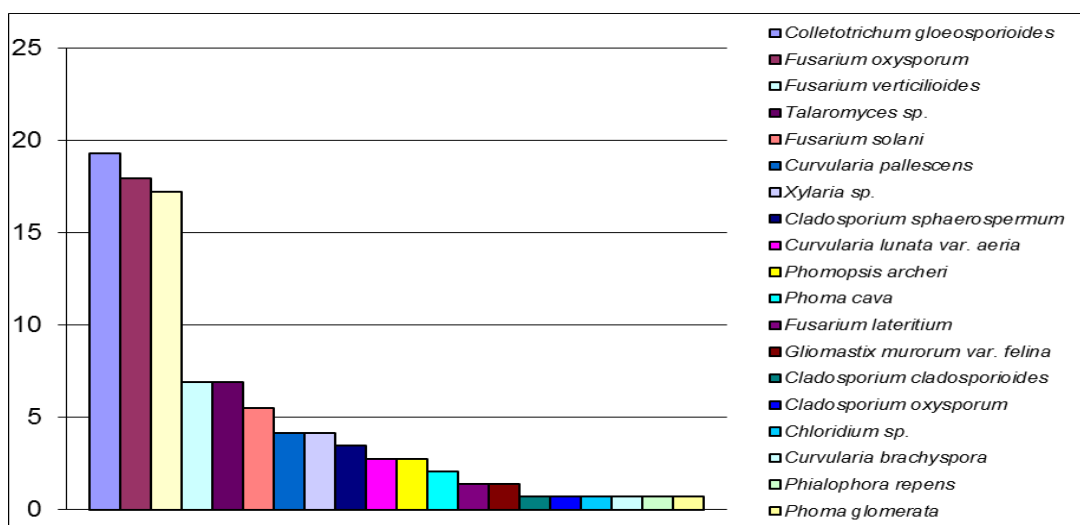


Figura 8. Porcentagem de fungos endofíticos isolados de *Equisetum arvense* na coleta 1.

Na coleta 2 a espécie que apresentou maior frequência de colonização (21,38%) foi *C. gloeosporioides*, seguido por *C. oxysporum* (6,9%) e *F. oxysporum* (6,21%). Os demais isolados apresentaram frequência abaixo de 3,5% (Figura 9).

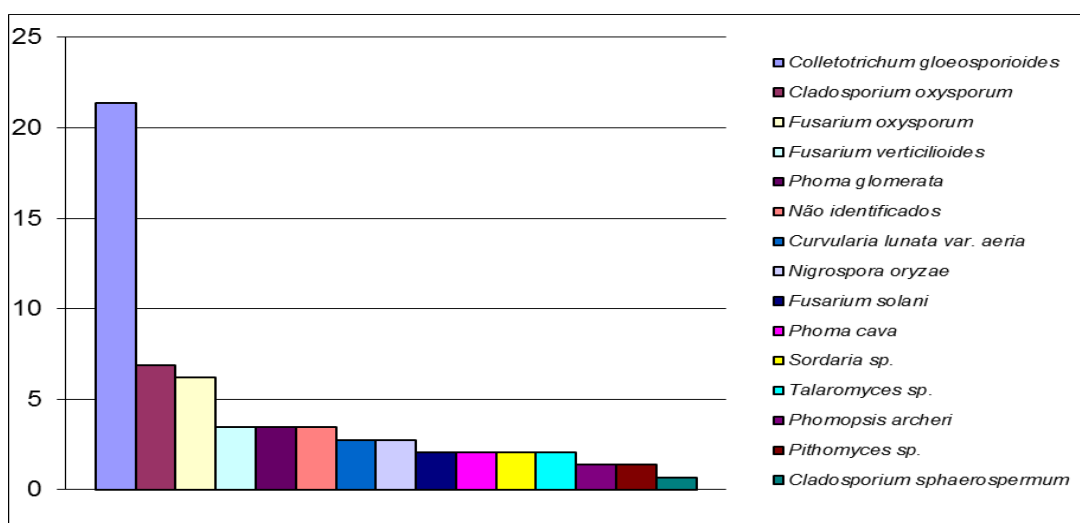


Figura 9. Porcentagem de fungos endofíticos isolados de *Equisetum arvense* na coleta 2.

Algumas espécies ocorreram apenas na coleta 1: *C. cladosporioides*, *C. brachyspora*, *C. pallescens*, *F. lateritium*, *G. murorum* var. *felina*, *P. repens* e *Xylaria* sp.. Enquanto que, *N. oryzae*, *Pithomyces* sp. e *Sordaria* sp. foram isolados exclusivamente na coleta 2.

O caule de *E. arvense* apresentou uma densidade média de fungos endofíticos de 23% e um total de 138 isolados em comparação com os isolados da raiz (16,16%), com um total de 97 isolados. Demonstraram especificidade com o caule: *C. sphaerospermum*, *C. brachyspora*, *G. murorum* var. *felina*, *N. oryzae*, *P. repens*, *Pithomyces* sp. e *Sordaria* sp.. Em relação a raiz foram específicos: *C. cladosporioides* e *Chloridium* sp. (Tabela 3). No que diz respeito ao número de espécies, foram encontradas 20 no caule e 15 na raiz.

Tabela 3. Fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Equisetum arvense* nas coletas em relação ao tecido vegetal analisado

Fungos Endofíticos	N(Caule)	F(%)	N(Raiz)	F(%)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0	0,00	1	1,02
<i>Cladosporium oxysporum</i>	3	2,19	8	8,16
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	6	4,38	0	0,00
<i>Chloridium</i> sp.	0	0,00	1	1,02
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	51	37,23	8	8,16
<i>Curvularia brachyspora</i>	1	0,73	0	0,00
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i>	5	3,65	3	3,06
<i>Curvularia pallescens</i>	1	0,73	5	5,10
<i>Fusarium lateritium</i>	1	0,73	1	1,02
<i>Fusarium oxysporum</i>	16	11,68	19	19,39
<i>Fusarium solani</i>	4	2,92	7	7,14
<i>Fusarium verticillioides</i>	5	3,65	10	10,20
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>felina</i>	2	1,46	0	0,00
<i>Nigrospora oryzae</i>	4	2,92	0	0,00
<i>Phialophora repens</i>	1	0,73	0	0,00
<i>Phoma cava</i>	5	3,65	1	1,02
<i>Phoma glomerata</i>	3	2,19	3	3,06
<i>Phomopsis archeri</i>	2	1,46	4	4,08
<i>Pithomyces</i> sp.	2	1,46	0	0,00
<i>Sordaria</i> sp.	3	2,19	0	0,00
<i>Talaromyces</i> sp.	4	2,92	9	9,18
<i>Xylaria</i> sp.	4	2,92	2	2,04
Não identificados	15	10,95	15	15,31
Total	138	100,00	97	100,00

N(Caule/Raiz)= Número de fungos; F(%)= Frequência de colonização.

Os fatores que podem ser importantes para estabelecer tal especificidade, incluem a estrutura, textura, fisiologia, bioquímica de cada tecido vegetal, a capacidade de utilização

de substratos específicos pelo fungo e características do ambiente como elevação, exposição, vegetação associada (Roll e Roll, 1979; Petrini e Carroll, 1981; Stone, 1987; Petrini e Fisher, 1990; Fisher *et al.*, 1994; Rodrigues, 1994). De fato, Petrini *et al.* (1992a) concluíram que os tecidos e órgãos vegetais podem apresentar microhabitats distintos e Taylor *et al.* (1999) confirmam a hipótese que cada espécie hospedeira pode funcionar como um ecossistema único. De acordo Arnold e Herre (2003), na dinâmica da interação microrganismo endofítico/planta hospedeira, inúmeros fatores abióticos e bióticos, podem exercer pressões seletivas que interferem na composição, frequência e especificidade das espécies endofíticas. Além da interferência das variáveis que naturalmente influenciam a comunidade de fungos endofíticos, diferenças nas metodologias empregadas no isolamento, tornam comparações entre estudos ainda mais problemáticas (Cannon e Simmons, 2002; Arnold *et al.*, 2001).

4.2. Atividade Antagônica de Fungos Endofíticos contra Fungos Fitopatogênicos

4.2.1. Avaliação do Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM)

O fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii* apresentou a maior média de crescimento (1,59 cm/dia), levando cerca de cinco dias para colonizar toda placa de Petri e os fungos *C. oxysporum*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum* e *G. murorum* var. *felina* foram os isolados endofíticos que apresentaram crescimento mais lento, cerca de 11 dias para colonizar toda a placa de Petri (Tabela 4). Apesar do seu crescimento lento, espécies do gênero *Cladosporium* são citadas na literatura pela sua habilidade antagônica a outras espécies fúngicas (Medeiros e Menezes, 1994). Da mesma forma, Sharma e Heather (1987) relataram a ação antagônica de *Cladosporium* spp. sobre agentes causadores de ferrugens em plantas.

Tabela 4. Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia) dos isolados fúngicos fitopatogênicos e endofíticos em meio BDA¹

Fungos	IVCM (cm/dia)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	0,76 cd
<i>Sclerotium rolfsii</i>	1,59 a
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i>	0,81 c
<i>Curvularia pallescens</i>	1,43 b
<i>Curvularia brachyspora</i>	0,79 c
<i>Cladosporium oxysporum</i>	0,65 ef
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,62 fg
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0,59 fg
<i>Fusarium solani</i>	0,71 de
<i>Fusarium verticillioides</i>	0,76 cd
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>felina</i>	0,56 g

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (5% de probabilidade).

4.2.2. Pareamento dos Fungos Endofíticos contra Fungos Fitopatogênicos

De acordo com a escala de Bell *et al.* (1982), seis dos nove isolados de fungos endofíticos (*C. lunata* var. *aeria*, *C. pallescens*, *C. brachyspora*, *C. oxysporum*, *F. solani* e *F. verticillioides*) confrontados com o fungo fitopatogênico *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* receberam nota 3 ao antagonismo, uma vez que nenhum indivíduo dominou o outro, ou seja, os dois fungos cresceram juntos até o centro da placa, ocorrendo paralização do crescimento dos isolados, com pouca ou nenhuma sobreposição de hifas. Por outro lado, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum* e *G. murorum* var. *felina* tiveram seu crescimento inibido visto que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cresceu sobre uma parte deles (cerca de 2/3 da placa) e receberam nota 4 ao antagonismo (Tabela 5; Figuras 10 e 11).

Tabela 5. Classes de antagonismo para os isolados de fungos endofíticos encontrados em *Equisetum arvense* contra o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Isolados	Classe de Antagonismo ¹
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i>	3
<i>Curvularia pallescens</i>	3
<i>Curvularia brachyspora</i>	3
<i>Cladosporium oxysporum</i>	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4
<i>Fusarium solani</i>	3
<i>Fusarium verticillioides</i>	3
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>felina</i>	4

¹De acordo com a escala de Bell *et al.* (1982).

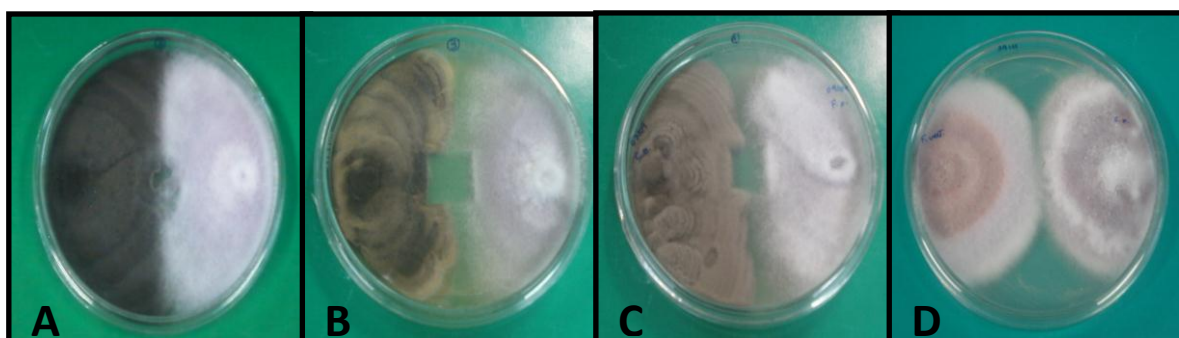


Figura 10. Pareamento entre os isolados de *Curvularia lunata* var. *aeria* (A), *Curvularia brachyspora* (B), *Cladosporium oxysporum* (C), *Fusarium verticillioides* (D) na esquerda e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na direita.

Resultados contrários aos obtidos no presente estudo foram verificados por Kumar *et al.* (2011) ao testarem o fungo endofítico *Alternaria* sp., isolado da planta medicinal *Tylophora indica*, o mesmo mostrou atividade antifúngica contra *F. oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* através da mesma técnica de cultura pareada.

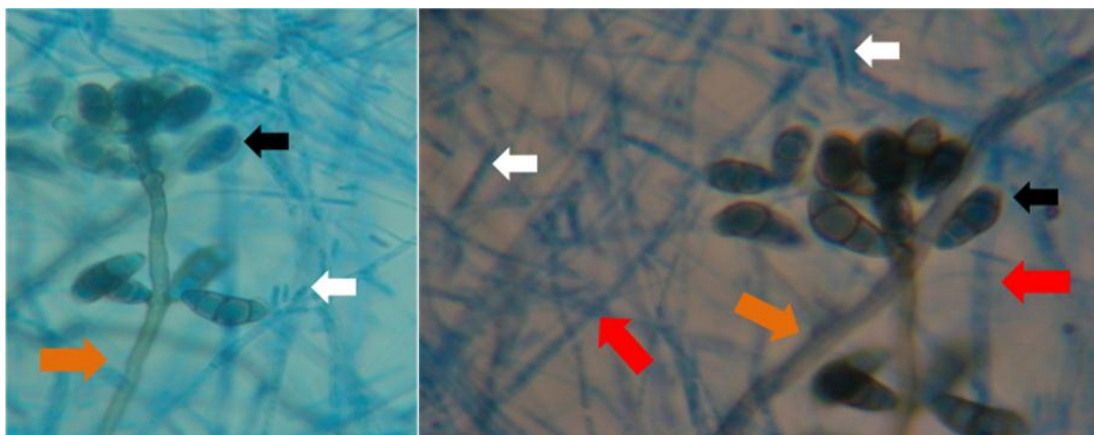


Figura 11. Microscopia do encontro entre *Curvularia lunata* var. *aeria*¹ e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*². Setas laranjas: hifas de 1; Setas vermelhas: hifas de 2; Setas pretas: conídios de 1; Setas brancas: conídios de 2.

Oliveira (1999) também observou resultados positivos quando comparados aos do presente trabalho, pois ao testar em cultivo pareado a capacidade antagônica de 16 fungos endofíticos isolados de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale*) contra *C. gloeosporioides*, verificou que o comportamento de *Emericella nidulans*, *Trichoderma pseudokoningii* e *C. cladosporioides* foi semelhante na redução do crescimento do fungo fitopatogênico, com elevadas porcentagens de inibição da ordem de 68,3%, 67,8% e 63,0%, respectivamente.

Mejía *et al.* (2008) ao utilizarem a técnica de cultura pareada entre fungos endofíticos de cacau (*T. cacao*) contra os principais fungos fitopatogênicos dessa cultura, observaram que das morfoespécies endofíticas testadas, 40%, 65% e 27% mostraram antagonismo contra *Moniliophthora roreri* (podridão parda), *Phytophthora palmivora* (podridão parda) e *Moniliophthora perniciosa* (vassoura de bruxa), respectivamente. O mecanismo antagônico mais comum foi a simples competição por substrato.

Utilizando a técnica de obtenção de extratos brutos, Rocha (2007) ao testar *in vitro* 88 isolados de fungos endofíticos de *Hevea brasiliensis* contra a germinação de *Microcyclus ulei* (fungo causador do mal-das-folhas na seringueira), observou resultados positivos, pois nas concentrações avaliadas (50% e 12,5%) 15 dos isolados apresentaram inibição acima de 80%.

Curvularia lunata var. *aeria* e *F. solani* isolados endofiticamente de folhas de *Musa* spp., mostraram ser potenciais antagonistas para o controle biológico, visto que inibiram 100% o crescimento de *Pseudocercospora musae*, com sobreposição de hifas (Assunção,

2010), com isso, receberam nota 1 ao antagonismo. No mesmo trabalho, *F. solani* também se mostrou um bom controlador, recebendo nota 2 (cresceu sobre uma parte do fungo fitopatogênico) quanto ao antagonismo de *Mycosphaerella musicola*. A autora também encontrou resultados semelhantes ao do presente estudo, onde *C. lunata* var. *aeria* e *F. solani* receberam nota 3 em relação ao antagonismo de *Cladosporium musae*, onde cresceram até 50% da placa de Petri. Os endofíticos do presente estudo que apresentaram nota 3, são considerados prováveis antagonistas. Esses resultados obtidos *in vitro* devem ser interpretados como de valor relativo para o controle desses fungos no campo (Bettiol *et al.*, 2009).

O fungo fitopatogênico *S. rolfsii* cresceu sobre todos os fungos endofíticos pareados, limitando o crescimento dos mesmos, recebendo nota 5 ao antagonismo (Tabela 6; Figura 12).

Tabela 6. Classes de antagonismo para os isolados de fungos endofíticos encontrados em *Equisetum arvense* contra o fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii*

Isolados	Classe de Antagonismo ¹
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i>	5
<i>Curvularia pallescens</i>	5
<i>Curvularia brachyspora</i>	5
<i>Cladosporium oxysporum</i>	5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5
<i>Fusarium solani</i>	5
<i>Fusarium verticillioides</i>	5
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>felina</i>	5

¹De acordo com a escala de Bell *et al.* (1982).

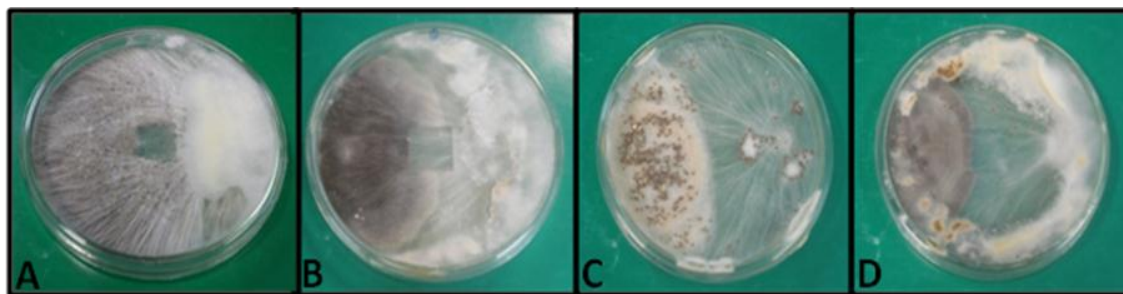


Figura 12. Pareamento entre os isolados de *Curvularia lunata* var. *aeria* (A), *Curvularia brachyspora* (B), *Curvularia pallescens* (C), *Cladosporium oxysporum* (D) na esquerda e *Sclerotium rolfsii* na direita.

Da mesma forma Sati e Arya (2010) confrontaram *S. rolfsii* contra cinco hyphomycetes endofíticos isolados de plantas ribeirinhas e verificaram que o mesmo não foi inibido por nenhum deles. No mesmo trabalho os autores observaram que o fungo endofítico *Tetrachaetum elegans* foi capaz de inibir o crescimento de *F. oxysporum* e de outros quatro fungos fitopatogênicos. Afirmando, ainda, que esta propriedade antagônica destes hyphomycetes aquáticos também pode ser usada no futuro para a exploração de compostos naturais, que podem competir com fungicidas sintéticos.

Foram obtidos, endofiticamente, quarenta e nove isolados de *Phomopsis* sp. de folhas e pecíolos da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* e os mesmos foram testados quanto a capacidade antagônica contra duas linhagens de *Guignardia citricarpa*, sendo 38 deles capazes de inibir o crescimento de *G. citricarpa* com valores acima de 50% (Gomes, 2008).

Resultados contrários foram observados por Cao *et al.* (2009) ao avaliarem o potencial de micoparasitismo de três fungos endofíticos (*Choiromyces aboriginum*, *Stachybotrys elegans* e *Cylindrocarpon* sp.) da planta *Phragmites australis* contra oito fungos fitopatogênicos habitantes do solo. A maioria dos isolados expressou inibição do crescimento micelial com reduções na faixa de 60 a 70%. *C. aboriginum* apresentou o maior efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* com uma redução de 100% em relação ao controle. Este mesmo fungo também sofreu ação pelo isolado endofítico *Cylindrocarpon* sp. e juntamente com *R. cerealis* demonstrou 93,3% de redução no crescimento.

Orole e Adejumo (2009) estudaram o efeito de fungos endofíticos (*Beauveria bassiana*, *Trichoderma koningii*, *Alternaria alternata*, *Phoma* sp. e *Acremonium strictum*) isolados de raízes de milho sobre os fungos fitopatogênicos isolados de plantas de milho

infectadas (*F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*, *F. verticillioides* e *Cladosporium herbarum*) e os resultados mostraram que *T. koningii* e *A. alternata* cresceram sobre o micélio de todos os fitopatogênicos.

Segundo Baker e Cook (1974), entre os efeitos dos fungos neste tipo de confronto estão a redução ou paralisação do crescimento micelial, a germinação de conídios, as distorções nas hifas e a endólise.

4.3. Ação Antimicrobiana dos Fungos Endofíticos frente a Isolados de Importância Médica

A atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos foi observada pela medição do halo de inibição sobre os microrganismos teste. Um grande halo de inibição indica uma forte atividade antimicrobiana. A maioria dos fungos produz e secreta um ou mais compostos com atividade antibiótica (Pal e Gardener, 2006).

Dos nove fungos endofíticos submetidos ao ensaio antimicrobiano em meio sólido, oito (*C. lunata* var. *aeria*, *C. pallescens*, *C. brachyspora*, *C. oxysporum*, *C. sphaerospermum*, *F. solani*, *F. verticillioides* e *G. murorum* var. *felina*) mostraram atividade contra pelo menos um microrganismo teste com halos de inibição variando de 6,83 a 19,16 mm (Tabela 7; Figura 13). *F. solani* apresentou o maior halo de inibição para a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*. Esta bactéria foi sensível a todos os isolados endofíticos, exceto ao *C. cladosporioides*. *F. solani* também demonstrou halos de inibição de 9,33, 14,33 e 14 mm, respectivamente para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, não inibindo apenas a bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*, que se mostrou resistente aos demais fungos endofíticos avaliados. Este isolado também apresentou atividade contra o fungo leveduriforme *C. albicans*. *F. verticillioides* apresentou atividade contra *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de *Equisetum arvense* frente a quatro bactérias e a um fungo patogênicos ao homem

Fungos Endofíticos	Microrganismos teste/UFPEDA ¹				
	02	86	396	224	1007
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i>	-	++	-	-	-
<i>Curvularia pallescens</i>	+	+	-	+	-
<i>Curvularia brachyspora</i>	-	++	-	-	-
<i>Cladosporium oxysporum</i>	-	++	-	+	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	++	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	+	++	-	++	++
<i>Fusarium verticillioides</i>	+	++	-	+	-
<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>felina</i>	+	++	-	-	-

¹UFPEDA 02: *Staphylococcus aureus*; UFPEDA 86: *Bacillus subtilis*; UFPEDA 396: *Klebsiella pneumoniae*; UFPEDA 224: *Escherichia coli*; UFPEDA 1007: *Candida albicans*.

-: sem atividade; +: halo de inibição de até 10 mm; ++: halo de inibição maior do que 10 mm.

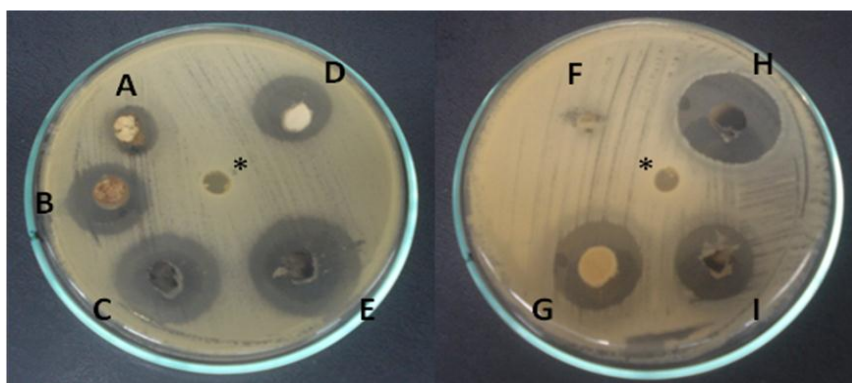


Figura 13. Halos de inibição de *Bacillus subtilis* formados em presença de fungos endofíticos isolados de *Equisetum arvense*. A: *Gliomastix murorum* var. *felina*; B: *Curvularia pallescens*; C: *Curvularia lunata* var. *aeria*; D: *Fusarium verticillioides*; E: *Curvularia brachyspora*; F: *Cladosporium cladosporioides*; G: *Fusarium solani*; H: *Cladosporium oxysporum* e I: *Cladosporium sphaerospermum*. *Controle.

Assim como no presente trabalho, Ding *et al.* (2010) também observaram halos de inibição com menos de 20 mm de diâmetro. Esses autores testaram a atividade antimicrobiana de 26 isolados de fungos endofíticos da tradicional planta medicinal chinesa *Camptotheca acuminata* contra duas bactérias fitopatogênicas, *Pseudomonas*

solanacearum e *Ralstonia solanacearum*, e 34,6% dos 13 isolados testados apresentaram ação contra um dos microrganismos e apenas 15,4% contra os 2 isolados fitopatogênicos, onde a maioria dos halos de inibição foram entre 10 e 14 mm. Semelhantemente, Cui *et al.* (2011) em estudo de atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados do caule de *Aquilaria sinensis*, planta usada na medicina tradicional chinesa, verificaram que 46,4% dos isolados endofíticos mostraram inibição do crescimento contra pelo menos um dos microrganismos teste (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*). Da mesma forma, Nascimento (2009) ao testar 35 isolados de fungos endofíticos de folhas da planta medicinal *Calotropis procera*, verificou que seis apresentaram ação antimicrobiana com halos de inibição de até 20 mm. Neste trabalho a autora observou também que esta capacidade foi apenas contra bactérias Gram-positivas, com destaque para o isolado *C. pallescens* com halos maiores que 15 mm para *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*.

A espécie *C. cladosporioides* nas condições desse estudo não foi capaz de inibir nenhum dos microrganismos teste. Semelhantemente, Gond *et al.* (2010), quando estudaram os fungos endofíticos da planta medicinal indiana *Nyctanthes arbor-tristis*, verificaram que espécies do gênero *Cladosporium* sp., não apresentaram ação contra nenhum dos microrganismos testados. O contrário foi observado no trabalho de Nascimento (2009), onde *C. cladosporioides*, isolado de *C. procera*, foi capaz de inibir o crescimento de um fungo patogênico ao homem (*Epidermophyton floccosum*) e uma bactéria (*Mycobacterium smegmatis*). No presente estudo, *C. oxysporum* foi capaz de formar halos de inibição para *B. subtilis* e *E. coli*, por outro lado, *C. sphaerospermum* formou apenas em *B. subtilis*.

Pinto (2003) testou 24 fungos endofíticos de folhas da planta medicinal *Lonchocarpus guilleminianus* e verificou que dez destes isolados apresentaram atividade no ensaio em “bloco de gelose” para *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* e *Candida* spp. (isoladas de pacientes imunodeprimidos). O fungo endofítico RM-13 foi o que mostrou maior halo de inibição (25 mm) para *Candida* sp. Utilizando a mesma metodologia, Conti (2007) avaliou a ação antimicrobiana de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Borreria verticillata* contra cinco microrganismos teste (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Candida* sp.), onde nove mostraram inibição (sete não identificados e dois do gênero *Penicillium*) e apenas *Candida* sp. não foi inibida por nenhum dos fungos endofíticos testados.

Siqueira *et al.* (2011) também realizaram um ensaio antimicrobiano em meio sólido com 203 fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Lippia sidoides*, dos quais 16 mostraram atividade contra pelo menos um microrganismo teste de interesse médico (dois fungos: *Trichophyton rubrum* e *Malassezia furfur* e duas bactérias: *S. aureus* e *B. subtilis*) com halos de inibição de 12 a 30 mm.

Guimarães *et al.* (2008), estudaram a micobiota endofítica das plantas medicinais *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, isolaram 39 fungos e testaram a atividade antimicrobiana dos seus extratos e observaram que dois extratos (5,1%) apresentaram atividade contra *S. aureus*, enquanto que 10 extratos (25,6%) foram ativos contra *E. coli* e 25 (64,1%) mostraram atividade significativa contra *C. albicans*.

Kharwar *et al.* (2011) testaram 12 fungos endofíticos da planta medicinal *Adenocalymma alliaceum* em relação ao seu potencial antibacteriano, e nove (75%) destes mostraram potencial contra um ou mais bactérias patogênicas ao homem (*Shigella flexnii*, *Salmonella enteritidis*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii*). No mesmo estudo, os fungos *A. alternata*, *C. lunata*, *Penicillium* sp. e *Chaetomium globosum* se destacaram ao mostrarem atividade de amplo espectro contra quatro dos cinco microrganismos teste.

Uma menor atividade antimicrobiana (8,3%) foi verificada por Gong e Guo (2009), ao avaliarem os fungos endofíticos isolados das plantas medicinais *Dracaena cambodiana* e *Aquilaria sinensis*. Em outros estudos, os fungos endofíticos *A. alternata*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp., isolados de outras plantas medicinais foram capazes de inibir *S. aureus*, *S. aureus* resistente à metilina e *B. subtilis* (Souza *et al.*, 2004; Chareprasert *et al.*, 2006; Phongpaichit *et al.*, 2006; Sette *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Fungos não esporulantes foram os mais frequentemente isolados da planta medicinal *Camptotheca acuminata* e foram também os principais bioativos contra as bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. Coli* e o fungo *C. albicans* (Krohn *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2007).

Os fungos endofíticos do presente estudo que formaram halos inibição, demonstram potencialidade na produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias e fungos patogênicos ao homem, lançando novas perspectivas sobre o potencial biotecnológico dos mesmos e apoiando a necessidade de estudos posteriores para elucidação dos prováveis compostos bioativos produzidos por estes microrganismos.

5. CONCLUSÕES

- Hyphomycetes é o grupo com maior número de representantes da micobiota endofítica em *Equisetum arvense*;
- Não há diferença significativa entre a densidade média dos fungos endofíticos de *E. arvense* entre as coletas realizadas;
- Os tecidos de *E. arvense* analisados não demonstram diferença significativa entre a frequência relativa de isolamento dos fungos endofíticos;
- *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum* são os fungos endofíticos mais frequentes em *E. arvense*;
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Sclerotium rolfsii* não são antagonizados pelos fungos endofíticos testados;
- *Fusarium solani* demonstra melhor resultado no teste antimicrobiano em meio sólido, inibindo a maioria dos microrganismos patogênicos testados;
- Futuros estudos são necessários para identificar os compostos ativos produzidos pelos fungos endofíticos testados visando à elucidação do papel simbiótico desses em *E. arvense*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleixo, J. 1995. Essências florais brasileiras. São Paulo: Ground.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Aly, A.H.; Debbab, A.; Kjer, J.; Prosch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* 41: 1-6.
- Andreote, F.D.; Lacava, P.T.; Azevedo, J.L. 2008. Diversidade Molecular de Microrganismos Endofíticos. In: Figueiredo, M.V.B.; Burity, H.A.; Stamford, N.P.; Santos, C.E.R. (Eds.). *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura*. Agrolivros, Guaíba. p. 229-253.
- Araújo, W.L.; Maccheroni Jr, W.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Barroso, P.A.V.; Saridakis, H.O.; Azevedo, J.L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47: 229-236.
- Araújo, W.L.; Lima, A.O.S.; Azevedo, J.L.; Marcon, J.; Sobral, J. K.; Lacava, P.T. 2002. *Manual de isolamento de microorganismos endofíticos*. Piracicaba, ESALQ.
- Araújo, W.L.; Lima, A.O.S.; Azevedo, J.L.; Marcon, J.; Sobral, J. K.; Lacava, P.T. 2005. *Manual: Isolamento de microorganismos endofíticos*. 3ª reimpressão. Departamento de Genética. Piracicaba, ESALQ.
- Araújo, W.L.; Lacava, P.T.; Marcon, J.; Lima, A.O.S.; Sobral, J.K.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Azevedo, J.L. 2010. *Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos*. Piracicaba: Calo.
- Arnold A.E.; Maynard Z.; Gilbert G.S.; Coley P.D.; Kursar, T.A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.* 3: 267-274.
- Arnold, A.E.; Maynard, Z.; Gilbert, G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research* 105: 1502-1507.
- Arnold, A.E.; Herre, E.A. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95: 388-398.
- Arnold, A.E.; Mejía L.C.; Kyllö, D.A.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Robbins, N.A.; Herre, E.A. 2003. Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage in a Tropical Tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 15649-15654.
- Assunção, M.M.C. 2010. Fungos endofíticos isolados de bananeira (*Musa* spp.) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 171p.
- Ayres, M.; Ayres Jr., M.; Ayres, D.L.; Santos, A.A. *BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. 2007. Versão 5.0. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/download/index.php?dirpath=./BioEstat%20Portugues&order=0>. Acesso em: 20 de novembro, 2011.
- Azevedo, J.L. 1998. Microrganismos endofíticos. In: Mello, I. S. & Azevedo, J. L. (Ed.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 117-137.
- Azevedo, J.L.; Maccheroni Jr., W.; Pereira, J.O.; Araújo, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants.

- Electronic Journal of Biotechnology* 3(1): 40-65. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>>. Acesso em: 10 abril 2011.
- Azevedo, J.L.; Serafini, L.A.; Barros, N.M. 2002. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini, L.A.; Barros N.M.; Azevedo, J.L. (eds.) *Biotecnologia: avanços na agricultura e na indústria*. Caxias do Sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, p. 233-265.
- Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. 2007. *Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects*. In: Fungi: multifaceted microbes (B.N. Ganguli & S.K. Deshmukh, eds.) Anamaya Publishers, New Delhi, p. 189-207.
- Bacon, C.W.; White, J.F. 2000. *Microbial endophytes*. New York, Marcel Dekker. 487p.
- Bae, H.; Kim, S.; Sicher, R.C.; Kim, M.S.; Kim, S-H; Strem, M.D.; Melnick, R.L.; Bailey, B.A. 2008. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum*, delays the onset of drought stress in *Theobroma cacao*. *Biol. Control*. 46: 24-35.
- Bandara, W.M.M.S.; Seneviratne, G.; Kulasoorya, S.A. 2006. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal of Biosciences* 31(5): 645-650.
- Baker, K.F.; Cook, R.J. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco.
- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. 1987. *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Barrow, J.R.; Lucero, M.E.; Reyes-Vera, I.; Havstad, K.M.. 2008. Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? *Communicative & Integrative Biology* 1: 69-73.
- Bell, D.K.; Wells, H.D.; Markham, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72(4): 379-382.
- Bent, E.; Chanway, C.P. 1998. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 980-988.
- Bettiol, W.; Morandi, M.A.B.; Pinto, Z.V.; Paula Junior, T.J.; Correa, E.B.; Moura, A.B.; Lucon, C.M.M.; Costa, J.C.B.; Bezerra, J.L. 2009. *Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas*. Revisão Anual de Patologia de Plantas 17: 111-147.
- Bills, G.; Dombrowski, A.; Pelaez, F.; Polishook, J.; Na, Z. 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In: *Tropical Mycology: Micromycetes*. New York, p.165-194.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 236p.
- Bowers, J.H.; Bailey, B.A.; Hebbar, P.K.; Sanogo, S.; Lumsden, R.D. 2001. The impact of plant disease on world chocolate production. *Planta Health Progress*. <http://www.apsnet.org/online/feature/cacao>. Acesso em: 10/10/2011.
- Cannon, P.F.; Simmons, C.M. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* 94: 210-220.
- Cao, R.; Liu, X.; Gao, K.; Mendgen, K.; Kang, Z.; Gao, J.; Dai, Y.; Wang, X. 2009. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes *in vitro*. *Curr. Microbiol.* 59: 584-592.

- Carmichael, J.W.; Kendrick, W.B.; Connors, I.L.; Singler, L. 1980. *Genera of Hyphomycetes*. University of Alberta Press, Canadá, 369p.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1): 2-9.
- 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. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology* 148: 2675-2685.
- Chareprasert, S.; Piapukiew, J.; Thienhirun, S.; Whalley, A.J.S.; Sihanonth, P. 2006. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 481-486.
- Chen, G.; Lin, Y.; Wen, L.; Vrijmoed, L.L.P.; Jones, E.B.G. 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungi from an estuarine mangrove on the South China Sea Coast. *Tetrahedron* 59: 4907-4909.
- Chen, X.Y.; Qi, Y.D.; Wei, J.H.; Zhang, Z.; Wang, De L.; Feng, J.D.; Gan, B.C. 2011. Molecular identification of endophytic fungi from medicinal plant *Huperzia serrata* based on rDNA ITS analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 495-503.
- Cemtchujnicov, J.D. 1976. *Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico, agrícolas, ornamentais e medicinais*. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Collado, J.; Platas, G.; González, I.; Peláez, F. 1999. Geographical and seasonal influences on distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist* 144: 525-532.
- Coley, P.D.; Barone, J.A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Reviews Ecology Systematic* 27: 305-335.
- Conti, R. 2007. Diversidade e atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos da planta medicinal *Borreria verticillata* (L.) G. F. W. Meyer. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 59p.
- Cornick, J.; Standwertha, A.; Fisher, P.J. 2005. A preliminary study of fungal endophyte diversity in a stable and declining bed of *Spartina anglica* Hubbard. *Mycologist* 19: 24-29.
- Corrado, M.; Rodrigues, K.F. 2004. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology* 44(2): 157-160.
- Corrêa, P.M. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Cui, J-L; Guo, S-X; Xiao, P-G. 2011. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. *Biomed. & Biotechnol.* 12(5): 385-392.
- D'Agostino, M.; Dini, A.; Pizza, C.; Senatore, F.; Aquino, R. 1984. Sterols from *Equisetum arvense*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 60: 2241-2245.
- Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 455-463.
- Dennis, C.J.; Webster, J. 1971. Antagonism properties of species-groups of *Trichoderma*, III. Hyphal interaction. *Transactions of British Mycological Society* 57(3): 363-369.
- Ding, T.; Jiang, T.; Zhou, J.; Xu, L.; Gao, Z.M. 2010. Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Genetics and Molecular Research* 9(4): 2104-2112.
- Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T. 1993. *Compendium of soil fungi*. San Francisco: IHW-Verlag, 859p.

- Durán, E.L.; Ploper, L.D.; Ramallo, J.C.; Piccolo Grandi, R.A.; Hupper Giancoli, Á.C.; Azevedo, J.L. 2005. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. *Can. J. of Botany* 83: 350-355.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 608p.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 507p.
- Espinosa-Garcia, F.J.; Longenheim, J.H. 1990. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population-diversity and spatial patterns. *New Phytol.* 116: 89-98.
- Esposito, E.; Azevedo, J.L. 2010. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2. ed. revisada e ampliada. Caxias do Sul: Educs, 638p.
- Eyberger, A.L.; Dondapati, R.; Porter, J.R. 2006. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products* 69: 1121-1124.
- Faeth, S.H.; Hammon, K.E. 1997. Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and association with leafminers. *Ecology* 78: 810-819.
- Faeth, S.H. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos* 98: 25-36.
- Ferreira, V.B.N. 2001. Estudo químico e avaliação do potencial antioxidante da *Equisetum arvense* e da *Marsypianthes chamaedrys*. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Química – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. 79p.
- Filgueira, F.A.R. 2005. Solonáceas II. Tomate: a hortaliça cosmopolita. In: *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna para a produção de hortaliças*. 2ª edição revista e ampliada. Viçosa: Ed. UFV. p. 193-238.
- Ficher, P.J.; Petrini, O.; Petrini, L.E.; Sutton, B.C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytol.* 127: 133-137.
- Fisher, P.J. 1996. Survival and spread of the endophytes *Stagonospora pteridiicola* in *Pteridium aquilinum*, other ferns and some flowering plants. *New Phytology* 132: 119-122.
- Forès, R. 2004. *Atlas das Plantas Medicinais e Curativas: A saúde através das plantas*. Ilustrações Editora Vergara Brasil. Cotia, SP.
- Franco, L.L. 2001. *As Sensacionais 50 Plantas Medicinais + Algas – Campeãs de Poder Curativo: volume II/Lelington Lobo Franco – Curitiba: O autor*, 255p.
- Freire, F.C.O.; Bezerra, J.L. 2001. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. *Summa Phytopathologica* 27(3): 304-308.
- Freyermuth, S.K.; Long, R.I.G.; Mathur, S. 1996. Metabolites aspects of plant interaction with commensal methylotrophs. In: Lidstrom, M.E. & Tabits, F.R. (eds.). *Microbial growth on C1 compounds*. Kluwer, The Netherlands. pp. 277-284.
- Fryar, S.C.; Booth, W.; Davies, J.; Hodgkiss, I.J.; Hyde, K.D. 2004. Distribution of fungi on wood in the Tutong River, Brunei. *Fungal Diversity* 17: 17-38.
- Gamboa, M.A.; Bayman, P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*. 33(2): 352-360.
- Gamboa M.A.; Laureano S.; Bayman, P. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycopathologia* 156: 41-45.
- Gao, X.; Zhou, H.; Xu, D.; Yu, C.; Chen, Y.; Qu, L. 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth. 112 revealed and cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letters* 249: 255-266.

- García-Pajón, C.M.; Collado, I.G. 2003. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Nat. Prod. Rep.* 20: 426-431.
- Ghini, R.; Kimati, H. 1989. Método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagonistas a *Botrytis cinerea*. Jaguariúma: EMBRAPA-CNPDA (Boletim de Pesquisa, 3), 13p.
- Ghini, R.; Nakamura, D. 2001. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade de solos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em microcosmos e *in vivo*. *Summa Phytopathol.* 27(3): 318-322.
- Gomes, R.R. 2008. *Phomopsis* spp. endófitos de plantas medicinais: Diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa*. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná. 166p.
- Gond, S.K.; Verma, V.C.; Kumar, A.; Kumar, V.; Kharwar, R.N. 2007. Study of endophytic fungal community from different of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1371-1375.
- Gond, S.K.; Mishra, A.; Sharma, V.K.; Verma, S.K.; Kumar, J.; Kharwar, R.N.; Kumar, A. 2010. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycoscience*. DOI: 10.1007/s10267-011-0146-z.
- Gong, L.J.; Guo, S.H. 2009. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *Afr. J. Biotechnol.* 8(5): 731-736.
- Guimarães, D.O.; Borges, W.S.; Kawano, C.Y.; Ribeiro, P.H.; Goldman, G.H.; Nomizo, A.; Thiemann, O.H.; Oliva, G.; Lopes, N.P.; Pupo, M.T. 2008. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52: 134-144.
- Gunatilaka, A.A.L. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* 69(3): 509-526.
- Guo, B.; Wang, Y.; Sun, X.; Tang, K. 2008. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 44(2): 136-142.
- Hallmann, J.; Quadtschallmann, A.; Mahaffee, W.F.; Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. of Microbiology* 43: 895-914.
- Hallmann, J.; Quadts-Hallmann, W.; Rodrigues-Kábana, R.; Kloepper, J.W. 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in *Cotton* and *Cucumber*. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 925-937.
- Hanlin, R.T. 2000. *Illustrated genera of Ascomycetes*. APS Press. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Hawksworth, D.L. 1998. The variety of fungal-algal symbiosis, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical J. of the Linnean Society* 96: 3-20.
- Hawksworth, D.L. 2000. How many fungi are there? *Mycological Research* 104: 4-5.
- Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* in plants. *Recent Research Development* 1: 207-213.
- Huang, Y.; Wang, J.; Li, G.; Zheng, Z.; Su, W. 2001. Tumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol. and Medical Microbiol.* 31: 163-167.
- Huang, W.Y.; Cai, Y.Z.; Hyde, K.D.; Corke, H.; Sun, M. 2007. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L. (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 23: 1253-1263.

- Huang, W.Y.; Cai, Y.Z.; Hyde, K.D.; Corke, H.; Sun, M. 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33: 61-75.
- Hyde, K.D.; Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163-173.
- Ichikawa, T.; Date, M.; Ishikura, T.; Ozaki, A. 1971. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol* 16: 218-224.
- Johri, B.N. 2006. Endophytes to the rescue of plants! *Current Science* 90(10): 1315-1316.
- Johnson, G.I.; Mead, A.J.; Cooke, A.W.; Dean, J.R. 1992. Mango stem and rot pathogens – Fruit infection by endophytic colonization of inflorescence and pedicel. *Annual Applied Biology* 120: 225-234.
- Kawchuk, L.M.; Hachey, J.; Lynch, D.R.; Kulcsar, F.; Van Rooijen, G.; Waterer, D.R.; Robertson, A.; Kokko, E.; Byers, R.; Howard, R.J.; Fischer, R.; Prüfer, D. 2001. Tomato Ve disease resistance gene encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Science* 98: 6511-6515.
- Kharwar, R.N.; Verma, V.C.; Strobel, G.; Ezra, D. 2008 The endophytic fungal lex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Curr. Science* 95: 228-233.
- Kharwar, R.N.; Gond, S.K.; Kumar, A.; Mishra, A.; 2010. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1941-1948.
- Kharwar, R.N.; Verma, S.K.; Mishra, A.; Gond, S.K.; Sharma, V.K.; Afreen, T.; Kumar, A. 2011. Assessment of diversity, distribution and antibacterial activity of endophytic fungi from a medicinal plant *Adenocalymma alliacea* Miers. *Symbiosis*. DOI: 10.1007/s13199-011-0142-2.
- Kinkel, L. 1991. Fungal community dynamics. In: Andrews, J.H.; Hirano, S.S.; (editors). *Microbial ecology of leaves*. New York (NY): Springer-Verlag. p. 253-270.
- Kogel, K.H.; Franken, P.; Hückelhoven, R. 2006. Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology* 9: 358-363.
- Krohn, K.; Flörke, U.; John, M.; Root, N.; Steingrover, K.; Aust, H-J; Draeger, S.; Schulz, B.; Antus, S.; Simonyi, M.; Zila, F. 2001. Biologically active metabolites from fungi Part 16. *New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations*. *Tetrahedron* 57: 4343-4348.
- Kumar, D.S.S.; Hyde, K.D. 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* 17: 69-90.
- Kumar, S.; Kaushik, N.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R.; Proksch, P. 2011. Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 27: 571-577.
- Kumaresan, V.; Suryanarayanan, T.S. 2001. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research* 105: 1388-1391.
- Kusari, S.; Lamshoft, M.; Zuhlke, S.; Spiteller, M. 2008. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products* 71: 159-162.

- Kusari, S.; Zuhlke, S.; Spiteller, M. 2009. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *J. Nat. Prod.* 72(1): 2-7.
- Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vaccari, E.M.; Melo, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9^a edição. São Paulo, Sarvier.
- Lappalainen, J.H.; Koricheva, J.; Helander, M.L.; Haukioja, E. 1999. Densities of endophytic fungi and performance of leafminers (Lepidoptera: Eriocraniidae) on birch along a pollution gradient. *Environmental Pollution* 104: 99-105.
- Larran, S.; Mónaco, C.; Alippi, H.E. 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 181-184.
- Legault, D.; Dessureault, M.; Laflamme, G. 1989. Mycoflore of the *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa* I. Champignons endophytes. *Can. J. of Botany* 67: 2053-2060.
- Lemus, I.; García, R.; Erazo, S.; Peña, R.; Parada, M.; Fuenzalida, M. 1996. Diuretic activity of an *Equisetum bogotense* tea (Platero herb): evaluation in healthy volunteers. *J. Ethnopharmacol.* 54: 55-58.
- Li, H.; Qing, C.; Zhang, Y.; Zhao, Z. 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1515-1519.
- Li, H-Y.; Zhao, C-A.; Liu, C-J.; Xu, X-F. 2010. Endophytic fungi diversity of aquatic/riparian plants and their antifungal activity in vitro. *Journal of Microbiology* 48(1): 1-6.
- Lilly, V.G.; Barnett, H.L. 1951. *Physiology of the fungi*. New York: McGraw-Hill Book Company, p. 24-44.
- Lima, T.E.F. 2010. Micobiota endofítica de *Vitis labrusca* L. cv. Isabel em regiões do Vale do Siriji, Pernambuco, Brasil. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 68p.
- Lin, X.; Lu, C.; Huang, Y.; Zheng, Z.; Su, W.; Shen, Y. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 23: 1037-1040.
- Lin, Z.; Zhu, T.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W. 2008. Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry* 69: 1273-1278.
- Liu, C. H.; Zou, W. X.; Lu, H.; Tan, R. X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* 88: 277-282.
- Lu, H.; Zou, W.X.; Meng, J C.; Hu, J.; Tan, R.X. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science* 151(1): 67-73.
- Maciá-Vicente, J.G.; Jansson, H.B.; Abdullah, S.K.; Descals, E.; Salinas, J.; Lopez-Llorca, L.V. 2008. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 90-105.
- Maheshwari, R. 2006. What is an endophytic fungus? *Current Science* 90(10): 1309.
- Marinho, A.M.R.; Rodrigues-Filho, E.; Moitinho, M.L.R.; Santos, L.S. 2005. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic

- fungus from fruits of *Melia azedarach*. *J. of the Brazilian Chem. Society* 16 (2): 280-283.
- Medeiros, S.A.F.; Menezes, M. 1994. Potencial antagonismo de alguns fungos a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo, agente da antracnose do cajueiro, *Anacardium occidentale* L.. *Fitopatologia Brasileira* 18(1): 84-91.
- Menjía, L.C.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Bael, S.V.; Arnold, A.E.; Hebbar, P.; Samuels, G.J.; Robbins, N.; Herre, E.A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46: 4-14.
- Melnroy, J.A.; Kloepper, J.W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and soil* 173: 337-342.
- Mendes, R.; Azevedo, J.L. 2007. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: Maia, L.C.; Malosso, E.; Yano-Melo, A.N. (orgs). *Micologia: avanços no conhecimento*. Sociedade Brasileira de Micologia, Recife. pp. 129-140.
- Misagui, I.J.; Donndelinger, C.R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- M'Piga, P.; Bélanger, R.R.; Paulitz, T.C.; Benhamou, N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-68. *Physiol. and Molecular Plant Pathol.* 50: 301-320.
- Mitich, L.W. 1992. Horsetail. *Weed Technology* 6(3): 779-781.
- Mota, A.M.; Gasparotto, L. 1998. Fungos associados à “síndrome da queda de frutos” da pupunheira. *Revista da Universidade do Amazonas: Série Ciência Agrária* 7: 69-79.
- Mota, M.A.; Campos, A.K.; Araujo, J.V. 2003. Biological control of helminth parasites of animals: current stage and future outlook. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 23(3): 93-100.
- Müller, C.B.; Krauss, J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 450-456.
- Nagai, T.; Myoda, T.; Nagashima, T. 2004. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food Chem.* 9: 389-394.
- Nascimento, T.L. 2009. Fungos endofíticos de *Calotropis procera* (AIT.) R. BR.: aspectos ecológicos e potencial antimicrobiano. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 75p.
- Oki, Y.; Fernandes, G.W.; Correa Junior, A. 2007. Fungos: amigos ou inimigos? *Ciência Hoje* 252: 64-66.
- Oliveira, F.C. 1999. Fungos endofíticos de folhas de cajueiro, *Anacardium occidentale* L.; propriedades antagonicas a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo, e avaliação enzimática através de eletrofores e substratos específicos. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 82p.
- Orole, O.O.; Adejumo, T.O. 2009. Activity of fungal endophytes against four maize wilt Pathogens. *African J. of Microbiol. Research* 3(12): 969-973.
- Osono, T. 2007. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. *Mycoscience* 48: 47-52.
- Owen, N.L.; Hundley, N. 2004. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. *Science Progress* 87(2): 79-99.

- Pal, K.K.; Gardener, M.B. 2006. *Biological Control of Plant Pathogens*. The Plant Health Instructor, vol. 2.
- Peixoto-Neto, P.A.S.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. 2002. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 29, ver pagina. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>>. Acesso em: 03 de agosto de 2011.
- Peláez, F.; Collado, J.; ArenaL, F.; Basilio, A.; Cabello, M.; Diez Matas, I.B.; Garcia, A.; Gonzalez Del Val, V.; Gonzalez, J.; Gorrochategui, P.; Hernandez, I.; Martin, I.; Platas, G.; Vicente, F. 1998. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Microbiol. Research* 102: 755-761.
- Petersen, P.J.; Wang, T.Z.; Dushin, R.G.; Bradford, P.A. 2004. Comparative *in vitro* activities of AC98-6446, a novel semisynthetic glycopeptide derivative of the natural product mannopeptimycin alpha, and other antimicrobial agents against gram-positives clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 48: 739-746.
- Petrini, O.; Dreyfuss, M.M. 1981. Endophytische Pilze epiphytischen Araceae, Bromeliaceae und Prchidaceae. *Sydowia* 34: 135-148.
- Petrini, O.; Carrol, G.C. 1981. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Can. J. of Botany* 59: 629-636.
- Petrini, O.; Fisher, P.J. 1990. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycological Research* 94: 1077-1080.
- Petrini O. 1991. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews J., Hirano S.S. (eds.). *Microbial ecology of leaves*. New York, Springs Verlag, pp. 179-197.
- Petrini O; Sieber, T.N.; Toti, L.; Viret, O. 1992a Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins* 1: 185-196.
- Petrini, O.; Stone, J.; Carroll, F.E. 1992b. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Can. J. of Botany* 60: 789-796.
- Phongpaichit, S.; Rungjindamai, N.; Rukachaisirikul, V.; Sakayaroj, J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunol. Medical Microbiology* 48: 367-372.
- Photita, W.; Lumyong, S.; Lumyong, P.; Hyde, K.D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 105: 1508-1513.
- Pilleggi, M.; Raiman, M.P.; Micheli, A.; Beatriz, S.; Bobato, V. 2002. Ação Antimicrobiana e interação endofítica em *Symphytum officinale* L. *Biol. and Health Sciences* 8(1): 47-55.
- Pileggi, S.A.V. 2006. Isolamento e Caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 141p.
- Pimentel, I.C.; Kuczkowski, F.R.; Chime, M.A.; Auer, C.G.; Grigoletti Junior, A. 2006. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta* 36(1): 123-128.
- Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Lopes, N.P.; Epifânio, R.A. 2002. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. *Química Nova* 25(1): 45-61.

- Pinto, L.D. 2003. Atividade antimicrobiana e caracterização molecular de microrganismos endofíticos isolados de folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco). Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 68p.
- Pupo, M.T.; Guimarães, D.O.; Furtado, N.A.J.C.; Borges, W.S. 2006. Microbial natural products; a promising source of bioactive compounds. *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry* (Taft, C.A., ed.), Research Signpost, Kerala, India. p. 51-78
- Puri, S.C.; Verna, V.; Amna, T.; Qazi, G.N.; Spiteller, M. 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Nat. Products* 68: 1717-1719.
- Radulovic N.; Stojanovic G.; Pálic R. 2006 Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytoter. Res.* 20: 85-8.
- Rico, H.; Gallego-Largo, J.L.; Hernandez, E.R.; Villa L.F.; Sanchez-Atrio, A., Seco, C., Gervas, J.J. 2000. Effects of silicon supplementation on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Calcif. Tissue Int.* 66: 53-55.
- Rocha, A.C.S. 2007. Antagonismo *in vitro* de fungos endofíticos isolados de *Hevea brasiliensis*, contra o *Microcyclus ulei* (fungo causador do mal-das-folhas na seringueira). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana. 141p.
- Rodrigues, K.F. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpeoleracea*. *Mycologia* 86: 376-385.
- Rodrigues, K.F.; Samuels, G. 1999. Fungal Endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *J. of Basic Microbiology* 39: 131-135.
- Rodrigues, K.F.; Hesse, M.; Werner, C. 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *J. of Basic Microbiology* 40(4): 261-267.
- Rodriguez, R.; Redman, R. 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J. of Experimental Botany* 59(5): 1109-1114.
- Roll, H.F.; Roll, H.H. 1979. Ascocoryne species in living stems of *Picea* spp. *Eur. J. For. Pathol.* 5: 275-280.
- Rosenblueth, M.; Martínez-Romero, M. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 827-837.
- Rubini, M.R.; Silva-Ribeiro, R.T.; Pomella, A.W.V.; Maki, C.S.; Araújo, W.L.; Santos, D.R.; Azevedo, J.L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of *Theobroma cacao* and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agente of Witches Broom disease. *International J. of Biological Sciences* 1(1): 24-33.
- Rudgers, J.A. 2004. Enemies of herbivores can shape plant traits: selection in a facultative ant-plant mutualism. *Ecology* 85: 192-205.
- Ryu, C.M.; Kim, J.; Choi, O.; Ki, S.H.; Park, C.S. 2006. Improvement of biological control capacity of *Penicillium polymyxa* E681 by seed pelleting of sesame. *Biological Control* 39: 282-289.
- Saikkonen, K.; Faeth, S.H.; Helander, M.; Sullivan, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Reviews Ecology; Systematic* 29: 319-343.

- Saikkonen, K.; Wäli, P.; Helander, M.; Faeth, S.H. 2004. Evolution of endophyte–plant symbioses. *TRENDS in Plant Science* 9(6): 275-280.
- Santamaria, J.; Bayman, P. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* 50: 1-8.
- Santos, R.M.G.; Rodrigues-Fo, E.; Rocha, W.C.; Teixeira, M.F.S. 2003. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 19: 767-770.
- Santos, G.; Blanco, M.; Monte, M. 2005. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extracts of *Equisetum arvense*. *Phytotherapy* 79: 508-513.
- Sapei, L.; Gierling, N.; Paris, O. 2007. Structural and analytical studies of silica accumulations in *Equisetum hyemale*. *Anal Bioanal. Chem.* 389: 1249-1257.
- Sati, S.G.; Belwal, M. 2005. Aquatic hyphomycetes as endophytes of riparian plant roots. *Mycologia* 97: 45-49.
- Sati, S.G.; Arya, P.; 2010. Antagonism of some aquatic hyphomycetes against plant pathogenic fungi. *The Scientific W. Journal* 10: 760-765.
- Schardl, C.L.; Phillips, T.D. 1997. Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? *Plant Disease* 81: 430-438.
- Schardl, C.L. 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Mol. Plant Microbe Interactions* 13: 1027-1033.
- Schulz, B.; Wanke, U.; Draeder, S.; Aust, H.J. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness on surface sterilization methods. *Mycol. Research* 97: 1447-1450.
- Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Aust, H.J.; Römmert, A.K.; Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Research* 169(9): 996-1004.
- Schulz, B.; Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Research* 109 (06): 661-686.
- Selosse, M.A.; Baudoin, E.; Vandenkoornhuyse, P. 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327: 639-648.
- Senthilkumar, M.; Govindassamy, V.; Anapura, K. 2007. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Curr. Microbiology* 55: 25-29.
- Sette, L.D.; Passarini, M.R.Z.; Delarmelina, C.; Salati, F.; Duarte, M.C.T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 22: 1185-1195.
- Sharma, I.K.; Heather, W.A. 1987. Temperature light intensity effect on the antagonism of species of *Cladosporium* to *Mellampsora laricipopulinapy* on cultivars of *Populus x Euramericana* (Dode) Guinier. *J. of Phytopatology* 120: 158-165.
- Shishido, M.; Breuil, C.; Chanway, C.P. 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Ecology* 29: 191-196.
- Silva, F. de A.S. *Assistat – Assistência estatística*. 2007. Versão 7.4 beta. UAEA-CTRN-UFCG Campina Grande-PB. Disponível em: <<http://assistat.sites.uol.com.br>>. Acesso em: 10 de maio de 2010.
- Siqueira, V.M.; Conti, R.; Araújo, J.M.; Souza-Motta, C.M. 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53: 89-95.

- Souza, A.Q.L.; Souza, A.D.L.; Astolfi-Filho, S.; Pinheiro, M.L.B.; Sarquis, M.I.M.; Pereira, J.O. 2004. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amaz.* 34: 185-195.
- Sridhar, K.R.; Bärlocher, F. 1992. Endophytic aquatic hyphomycetes of roots from spruce, birch and maple. *Mycol. Research.* 96: 305-308.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreans* an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260: 214-216.
- Stierle, A.; Strobel, G.A.; Stierle, D.; Grothans, P.; Bignami, G. 1995. The search for a taxol producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of Nat. Products* 58: 1315-1324.
- Stone, J.K. 1987. Initiation and development of latent infection by *Rhabdocline parkeri* on Douglas fir. *Can. J. Bot.* 65: 2614-2621.
- Stone, J.K.; Polishook, J.D.; White, J.R. F. 2004. Endophytic Fungi. In: Müller, J.M.; Bills, G.F.; Foster, M.S. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. *San Diego: Elsevier Academic Press*, p. 241-270.
- Strobel, G.; Yang, X.; Sears, J.; Kramer, R.; Sidhu, R.S.; Hess, W.M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142: 435-440.
- Strobel, G.A. 2002. Rainforest endophytic and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology* 22: 315-333.
- Strobel, G.A.; Ford, E.; Worapong, J.; Harper, J.K.; Arif, A.M.; Grant, D.M.; Fung, P.C.W.; Chau, R.M.W. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60: 179-183.
- Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535-544.
- Strobel, G.A.; Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. and Mol. Biology Reviews* 67(04): 491-502.
- Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Nat. Products* 67(2): 257-268.
- Suryanarayanan, T.S.; Kumaresan, V.; Johnson, J.A. 1998. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Can. J. of Microbiol.* 44: 1003-1006.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 96p.
- Taechowisan, T.; Peberdy, J.F.; Lumyong, S. 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 19: 381-385.
- Tan, R.X.; Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Prod. Reports* 18: 448-459.
- Taylor, J.E.; Hyde, K.D.; Jones, E.B.G. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist* 142: 335-346.

- Tejesvi, M.V.; Mahesh, B.; Nalini, M.S.; Prakash, H.S.; Kini, K.R.; Subbiah, V.; Hunthriker, S.S. 2005. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). *World J. Microbiol. and Biotechnol.* 21: 1535-1540.
- Tejesvi, V.M.; Kini, K.R.; Prakash, H.S.; Subbiah, V.; Shetty, H.S. 2007. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Div.* 24: 37-54.
- Teske, M.; Trentini, A.M.M. 1995. *Herbariu – Compêndio de Fitoterapia*. 2^a. ed. Herbarium Lab. Bot. LTDA. Curitiba-PR. p. 99-101.
- Tsavkelova, E.A.Q.; Cherdyntseva, T.A.; Botina, S.G.; Netnov, A.I. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxines. *Microbiol. Research* 162: 69-76.
- Unterseher, M.; Reiher, A.; Finstermeier, K.; Otto, P.; Morawetz, W. 2007. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycol. Progress* 6: 201-212.
- Veit, M.; Beckert, C.; Höhne, C.; Baver, K.; Geiger, H. 1994. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry* 38(4): 881-891.
- Ventura, J.A.; Costa, H. 2006. Epidemiologia e manejo das doenças causadas por *Fusarium*. *Fitopatol. Brasileira* 31: 93-96.
- Verma, V.C.; Gond, S.K.; Kumar, A.; Kharwar, R.N.; Strobel, G.A. 2007. Endophytic mycoflora from leaf, bark, and stem of *Azadirachta indica* A. Juss. from Varanasi (India). *Microb. Ecol.* 54: 119-125.
- Vieira, P.D.S.; Souza-Motta, M.C.; Lima, D.; Torres, J.B.; Quecine, M.C.; Azevedo, J.L.; Oliveira, N.T. 2011. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. *Mycology* 2(2): 91-97.
- Vujanovic, V.; Brisson, J. 2002. A comparative study of endophytic mycobiota in leaves of *Acer saccharum* in eastern North America. *Mycol. Progress* 1(2): 147-154.
- Wagenaar, M.; Corwin, J.; Strobel, G.A.; Clardy, J. 2000. Three new chytochalsins produced by an endophytic fungi in the genus *Rhinochalcidiella*. *Journal of Nat. Products* 63: 1692-1695.
- Wang Y.T.; Lo, H.S.; Wang, P.H. 2008. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*. *Bot. Stud.* 49: 39-43.
- White, J.F.; Reddy, P.V.; Bacon, C.W. 2000. Biotrophic endophytes of grasses: a systemic appraisal. In: Bacon, C.W.; White, J.F. (eds.). *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker.
- Wichtl, M. 1994. *Herbal drug and phytopharmaceuticals*. Medpharm Scientific Publishers: Stuttgart, pp. 188-191.
- Wilson, D.; Carroll, G.C. 1994. An endophyte of Oregon white oak: infection studies of *Discula quercina*. *Mycologia* 86: 635-647.
- Yaqub, F.; Shahzad, S. 2005. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different crops and effect of inoculation density on colonization of mungbean and sunflower roots. *Pak. J. Bot.* 37(1): 175-180.
- Yan, X.N.; Sikora, I.R.; Zheng, J.W.. 2011. Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B. Biomed. & Biotechnol.* 12(3): 219-225.

- Xu, J.; Ebada, S.S.; Proksch, P. 2010. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Divers.* DOI: 10.1007/s13225-010-0055-z.
- Zhang, B.; Salituro, G.; Szalkowski, D.; Li, Z.; Zhang, Y.; Royo, I.; Vilella, D.; Dez, M.; Pelaez, F.; Ruby, C.; Kendall, R.L.; Mao, X.; Griffin, P.; Calaycay, J.; Zierath, J.; Heck, J.V.; Smith, R.G.; Moller, D.E. 1999. Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* 284: 974-981.
- Zhang, H.W.; Song, Y.C.; Tan, R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* 23: 753-771.
- Zinniel, D.K.; Lambrecht, P.; Harris, B.N.; Feng, Z.; Kuczmarski, D.; Higley, P.; Ishimaru, C.A.; Arunakumari, A.; Barletta, R.G.; Vidaver, A.K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Envir. Microbiol.* 68(5): 2198-2208.
- Zou, W.X.; Meng, J.C.; Lu, H.; Chen, G.X.; Shi, G.X.; Zhang, T.Y.; Tan, R.X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Nat. Products* 63: 1529-1530.

