



RAFAEL JOSÉ VILELA DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM
FOLHAS DE *Cocos nucifera* L., EM GOIANA PERNAMBUCO, COM BASE EM
MORFOLOGIA E SEQUÊNCIAS DE rDNA**

**RECIFE
FEVEREIRO/2014**



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

**DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM
FOLHAS DE *Cocos nucifera* L., EM GOIANA PERNAMBUCO, COM BASE EM
MORFOLOGIA E SEQUÊNCIAS DE rDNA**

Rafael José Vilela de Oliveira

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 Taxonomia e Ecologia de Fungos

Orientadora Dra. Maria Auxiliadora Cavalcanti

Co-orientador Dr. Gladstone Alves da Silva

RECIFE

FEVEREIRO/2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Rafael José Vilela de

Diversidade e identificação de fungos endofíticos em folhas de *Cocos nucifera* L., em Goiana Pernambuco, com base em morfologia e sequências de rDNA/ Recife: O Autor, 2014.

60folhas :il., fig., tab.

Orientadora: Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti

Coorientador: Gladstone Alves da Silva

Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia de Fungos, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1.Fungos fitopatogenicos2. Palmeiral. Cavalcanti, Maria Auxiliadora de Queiroz (orientadora) II. Silva, Gladstone Alves da (coorientador) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 158

**DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM
FOLHAS DE *Cocos nucifera* L., EM GOIANA PERNAMBUCO, COM BASE EM
MORFOLOGIA E SEQUÊNCIAS DE rDNA**

RAFAEL JOSÉ VILELA DE OLIVEIRA

Data da defesa: 26/02/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr^a. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti – (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Luiz Bezerra
Universidade Federal do Recôncavo Baiano

Dr. João Lúcio de Azevedo
Universidade de São Paulo

**A Deus e
à minha família
dedico.**

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora que estão sempre ao meu lado.

A minha mãe Ladjane Vilela e ao meu pai Samuel Oliveira por todo carinho, amor, compreensão e investimento em minha educação.

As minhas queridas avós, meu avô e a todos familiares.

A minha namorada Pamella Ximenes pelo companheirismo, amor e paciência.

A minha querida orientadora, Prof^a Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti, pelos valiosos conhecimentos, amizade, paciência, puxões de orelha, e pela inestimável formação como pessoa e profissional a qual levarei para o resto da vida.

Aos professores e amigos André Santiago e Gladstone Silva.

As Professoras Maria José, Débora, Marilene, Cristina, Leonor e Oliane pela constante ajuda e ensinamentos na área de micologia.

A Msc. Thaís Feijó Emanuelle Lima pela amizade e por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus queridos companheiros do Laboratório: Renata, Carlos, Flávia, Diogo, Mayra, May, Roger, Sérgio, Danielle, Renata, Inácio, Natália, Angelo, Ingrid, Indra, Michelângello, Daniela, Carliane, Aline e Ildnay.

Aos meus queridos amigos e companheiros Jadson e Nelson que tanto me ajudaram nessa caminhada.

Ao Sr. Galo pela ajuda nas coletas.

Ao IPA e ao Dr. Manuel Américo pela autorização das coletas.

Muito obrigado!

RESUMO GERAL

Fungos endofíticos são micro-organismos que habitam o interior da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis. O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma espécie tropical, largamente distribuída na Ásia, África, América Latina e regiões do Pacífico, sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial. Devido à importância agroeconômica do coco, este trabalho teve por objetivo determinar a micobiota endofítica de folhas saudáveis de *C. nucifera* em duas cultivares (Anão-amarelo e Anão-verde) e um híbrido (PB 121) em Goiana, Pernambuco. No laboratório, fragmentos de raque e folíolo foram lavados com água corrente e sabão neutro, e com auxílio de um furador esterilizado foram feitos discos foliares (6 mm), posteriormente desinfestados em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 2 minutos e 30 segundos, em álcool 70% por 30 segundos e finalmente duas lavagens com água destilada esterilizada. Os fragmentos foram transferidos para placa de Petri, em triplicata, contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (50 mg.L⁻¹). Foram sequenciados a região ITS do rDNA dos isolados e em seguida verificada a similaridade Blastn e realizada análises filogenéticas. Índices de diversidade, curva de acumulação de espécies, similaridade e frequência de ocorrência foram calculados. O total de 1296 fragmentos de folhas/raques foram analisados e 474 espécimes de fungos endofíticos foram isolados e distribuídos em 31 gêneros e 37 espécies. As espécies identificadas são representantes do filo Ascomycota, pertencentes às classes Sordariomycetes, Dothideomycetes e Eurotiomycetes, além de *Occultifur externus*, *Rhodotorula marina* e *Pseudozyma hubeiensis* anamorfo do filo Basidiomycota e *Syncephalastrum racemosum* do filo Zygomycota. *Arthrinium xenocordella*, *Ascotricha guamenses*, *Phlyctaeniella* sp., *Pyrenochaetopsis decipiens*, *P. leptospora* e *Stenella musae* são citadas pela primeira vez como endofíticos. *Fusarium proliferatum*, *F. solani* e *Paecilomyces lilacinus* são reportadas pela primeira vez como endofíticos em *Cocos nucifera*.

Palavras-chave: Arecaceae; ITS; diversidade.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live inside the host plant. Their structures are not visible externally and these organisms do not cause any apparent damage to the host. The coconut (*Cocos nucifera* L.) is a tropical species, worldwide distributed, occurring in Asia, Africa, Latin America and Pacific regions. The Brazil is the fourth largest producer of coconut in the world. Due to the agro-economic importance of coconut, the aim of this study was to determine the endophytic fungi in the healthy leaves of two cultivars (yellow dwarf and green dwarf and a hybrid (PB 121) of *C. nucifera* in Goiana, Pernambuco. In the laboratory, fragments of petioles and leaflets were washed with tap water and soap. Leaf discs were cut with a sterile cork punch (6 mm diam.), decontaminated with alcohol (70%) for 1 min., sodium hypochlorite (2%) for 2.5 min. and 30 sec., alcohol (70%) for 30 sec. and finally twice washed with sterilized distilled water. The fragments were transferred to a Petri dish, in triplicate, containing Potato-Dextrose-Agar (PDA) with chloramphenicol (50 mg.L⁻¹). The ITS region was sequenced to isolates. The sequences were queried in the Blastn (NCBI) to recover the percentage of identity with other sequences deposited in the data base. Phylogeny, species accumulation, frequency of occurrence, diversity and similarity indexes were calculated. Fragments from 1296 leaves and petioles were analyzed, and were found 474 specimens of endophytic fungi distributed in 31 genera and 37 species. The identified species were mainly taxa from Ascomycota, belonging to the classes Sordariomycetes, Dothideomycetes and Eurotiomycetes. Some individuals are anamorphic of Basidiomycota (*Occultifur externus*, *Rhodotorula marina* and *Pseudozyma hubeiensis*) and Zygomycota (*Syncephalastrum racemosum*). *Arthrinium xenocordella*, *Ascotricha guamenses*, *Phlyctaeniella* sp., *Pyrenochaetopsis decipiens*, *P. leptospora* and *Stenella musae* are mentioned for the first time as endophytes. *Fusarium proliferatum*, *F. solani* and *Paecilomyces lilacinus* are newly reported as endophytes in *Cocos nucifera*.

Key-words: Arecaceae; ITS; diversity.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 – <i>Cocos nucifera</i> cultivar Anão verde em em Goiana, Pernambuco.	21
Figura 2 – <i>Cocos nucifera</i> cultivar Anão amarelo em em Goiana, Pernambuco.	22
Figura 3 – <i>Cocos nucifera</i> Híbrido PB121 em Goiana, Pernambuco.	23
Figura 4 – Similariade de fungos endofíticos isolados de <i>Cocos nucifera</i> em duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e um híbrido (PB121) em Goiana, Pernambuco.	30
Figura 5 – Curva de acumulação de espécies (Sob) e de estimativa de riqueza pelo índice Chao (Chao 1), Jacknife (Jacknife 1) e Bootstrap para a cultivar Anão amarelo.	31
Figura 6 – Curva de acumulação de espécies (Sob) e de estimativa de riqueza pelo índice Chao (Chao 1), Jacknife (Jacknife 1) e Bootstrap para a cultivar Anão verde.	31
Figura 7 – Curva de acumulação de espécies (Sob) e de estimativa de riqueza pelo índice Chao (Chao 1), Jacknife (Jacknife 1) e Bootstrap para o híbrido PB121.	32
Figura 8 - Filogramas obtidos a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento das espécies isoladas como endófitos de <i>Cocos nucifera</i> partencentes a classe Sordariomycetes. Valores de suporte são de análise bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.	35
Figura 9 - Filogramas obtidos a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento das espécies isoladas como endófitos de <i>Cocos nucifera</i> partencentes das classes Dothideomycetes e Eurotiomycetes. Valores de suporte são de análise bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.	37

Figura 10 - Filogramas obtidos a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento das espécies *Occultifur externus* e *Rhodotorula marina* isoladas como endófitos. Valores de suporte são de análise bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.

39

Figura 11. Filogramas obtidos a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento da espécie *Pseudozyma hubeiensis* isoladas como endófitos de *C. nucifera*. Valores de suporte são de análise bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.

40

Lista de tabelas

Pág.

Tabela 1 – Características climáticas da área de coleta de folhas de *Cocos nucifera* em Goiana, Pernambuco.

24

Tabela 2 – Frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos isolados de *Cocos nucifera* em duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e um híbrido (PB121) em Goiana, Pernambuco.

27

Tabela 3 – Riqueza de espécies (S), número de indivíduos (N), índices de diversidade de Shannon (H') e Margalef (D) e dominância de Pielou (J') em duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e um híbrido PB 121 de *Cocos nucifera*.

30

Tabela 4 – Riqueza de espécies (S), número de indivíduos (N), índices de diversidade de Shannon (H') e Margalef (D) e dominância de Pielou (J') em duas cultivares e um híbrido de *Cocos nucifera* no período de estiagem e chuvoso.

32

Tabela 5 – Identificação morfológica e molecular de fungos endofíticos isolados de *Cocos nucifera* em duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e um híbrido (PB121) em Goiana, Pernambuco.

33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Fungos endofíticos.....	15
2.1.1. Conceito de fungos endofítico.....	15
2.1.2. Importância dos fungos endofíticos.....	15
2.3. Ocorrência de fungos endofíticos na família Arecaceae.....	16
2.4. <i>Cocos nucifera</i>	18
2.4.1. Origem e importância.....	18
2.4.2. Classificação e caracterização das cultivares de coqueiro.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Local de coleta.....	20
3.2. Coleta do Material.....	20
3.3. Isolamento e identificação dos Fungos Endofíticos.....	24
3.4. Diversidade.....	25
3.5. Análise estatística.....	25
3.6. Frequência de ocorrência.....	25
3.7. Similaridade.....	25
3.8. Extração de DNA, amplificação de fragmentos do DNA e Sequenciamento.....	26
3.9. Análise Filogenética.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Diversidade de fungos endofíticos em <i>Cocos nucifera</i>	27
4.2. Diversidade de fungos endofíticos por cultivares.....	29
4.3. Diversidade de fungos endofíticos por período de coleta.....	32
4.4. Sequências e análise molecular de fungos endofíticos.....	32
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

A palavra endofítico vem do grego (*éndon* + *phytón*) e significa "dentro da planta". Um microrganismo endofítico, incluindo fungos e bactérias, é aquele que passa todo seu ciclo de vida (ou parte dele) colonizando inter ou intracelularmente os tecidos saudáveis da planta hospedeira, sem causar sintomas de doenças (Zou & Tan, 2001).

Os endofíticos têm despertado interesse da comunidade científica pelo potencial na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras (Souza *et al.*, 2004). Diversos trabalhos têm mostrado sua atuação no controle biológico de doenças e pragas, no aumento da tolerância a estresses abióticos, na promoção do crescimento da planta hospedeira e na produção de antimicrobianos (Pereira *et al.*, 1993; Araújo, 1996; Rodrigues & Dias Filho, 1996).

Os fungos endofíticos estabelecem uma relação com o hospedeiro que pode variar de mutualismo a um ligeiro parasitismo (Kjer *et al.*, 2009). Ao contrário dos fungos patogênicos, esses organismos não causam fitopatogenias aparentes a seus hospedeiros, podendo ser patógenos latentes, mutualísticos, comensalistas e/ou saprofíticos (Bacon & White, 2000; Schultz & Boyle, 2005; Kogel *et al.*, 2006).

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) foi introduzido no Brasil no Estado da Bahia (por isso a denominação coco-da-baía) com material proveniente da Ilha de Cabo Verde. É provável que tenha origem na Índia ou Sri Lanka. Passados alguns anos, o coqueiro foi também introduzido em países como Malásia, Costa do Marfim entre outros (Nucé de Lamothe, 1983).

A cocoicultura no Brasil vem se destacando nos últimos anos. Em 1990 o país ocupava a 10ª posição no ranking mundial, com uma produção ao redor de 477 mil toneladas de coco. Atualmente, o país é o quarto maior produtor mundial, produzindo aproximadamente 2,8 milhões de toneladas, em uma área de 287 mil ha plantada com coqueiros (Embrapa, 2011).

Apesar do cultivo do coqueiro estar sendo estimulado e introduzido em várias regiões do país, as maiores plantações e produções se concentram na faixa litorânea do Nordeste e parte da região Norte do Brasil. Nessas áreas o cultivo é favorecido pelas condições climáticas e ambas as regiões detêm cerca de 70% da produção do coco brasileiro (IBGE, 2009; Embrapa, 2011).

Devido a escassez de trabalhos referentes a ocorrência de fungos endofíticos em coqueiros e considerando à importância agroeconômica da cocoicultura para o estado de Pernambuco, é de importância que esses organismos sejam estudados. Dessa forma, esse trabalho visa contribuir para

o conhecimento sobre os fungos endofíticos encontrados em folhas sadias de *Cocos nucifera* em duas cultivares (Anão-amarelo e Anão-verde) e um híbrido (PB 121) em Goiana, Pernambuco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos endofíticos

2.1.1 Conceito de fungos endofíticos

A palavra endófito é derivada do grego (*éndon* + *phytón*), significa 'no interior da planta'. O primeiro relato sobre a definição do termo endofítico é o de De Barry (1866, apud Gamboa Gaitan, 2006). Em seus estudos com gramíneas, esse autor considerou endófitos os fungos que vivem no interior dos tecidos das plantas. Desde então o termo endofítico tem sofrido várias modificações.

Fidalgo & Fidalgo (1967) definem fungo endofítico como aquele que vive no interior do tecido vegetal. Em 1988, Carroll restringiu o termo endofítico a organismos que causam infecção assintomática nos tecidos internos de plantas, excluindo fitopatógenos, mutualistas e micorrizas. Segundo Petrini (1991), fungos endofíticos colonizam os tecidos saudáveis de partes aéreas da planta, em algum momento do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. De acordo com Schulz & Boyle (2005), fungos endofíticos colonizam uma planta sem causar sintomas visíveis de doenças em qualquer momento.

A definição mais completa e atual sobre o conceito de endofíticos é a de Azevedo & Araujo (2007) que definem como endofíticos todos os micro-organismos que habitam o interior da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis, excluindo micro-organismos que fixam nitrogênio atmosférico e produzem nódulos nas raízes vegetais, bem como os fungos micorrízicos, ambos conceitualmente endofíticos, mas que apresentam características próprias, sendo bem mais estudados que os endofíticos que habitam partes aéreas de plantas.

A distinção entre endofíticos, fitopatogênicos e oportunistas é puramente didática. O desequilíbrio dessa harmonia afeta o comportamento de todos os integrantes da comunidade, oferecendo condições para que os fungos oportunistas manifestem o seu potencial patogênico contra o hospedeiro (Azevedo *et al.*, 2000; Maki, 2006).

2.1.2 Importância dos fungos endofíticos

Apesar da interação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros ainda ser pouco conhecida, nas últimas décadas houve um constante aumento de estudos relacionados, ocorrendo novas

descobertas relacionadas ao potencial biológico, econômico e ecológico dessa interação. Em estudos recentes, foram constatados que cerca de 51% das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos eram desconhecidas anteriormente (Strobel, 2003). Segundo Schulz & Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas. Em revisão publicada em 2001, Zou e Tan já descreviam 184 metabólitos, isolados de 59 fungos, sendo 96 destes inéditos.

Certos fungos endofíticos produzem compostos igualmente presentes em suas plantas hospedeiras como exemplo pode-se citar o taxol, uma droga quimioterapêutica usada no tratamento de câncer de mama e ovário presente tanto na planta medicinal *Taxus brevifolia* Nutt., como no fungo endofítico *Taxomyces andreanae* Strobel, A. Stierle, D. Stierle & W.M. Hess (Stierle *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000 e Strobel *et al.*, 2003). Após a descoberta de que fungos endofíticos podem produzir taxol, visualizou-se um processo mais eficiente e menos dispendioso para produção deste fármaco (Neto *et al.*, 2003). *Pestalotiopsis microspora* (Speg.) Bat. & Peres isolada de *T. wallachiana* Zucc, também produz taxol (Strobel *et al.*, 1996). Possivelmente isso ocorre devido à recombinação genética entre o microrganismo e o hospedeiro ao longo da evolução conjunta dos simbioses (Strobel, 2006).

Os fungos endofíticos são produtores de metabólitos primários e secundários que podem conferir à planta a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos, resistência a doenças, aumento da área foliar, controle de microrganismos, bem como esses organismos podem produzir antimicrobianos, fitohormônios, toxinas, imunossuppressores, antitumorais e enzimas, atuando também no controle biológico de pragas e a promoção de crescimento vegetal (Read & Camp, 1986; Clay, 1988; West *et al.*, 1990, Stovall & Clay, 1991; Pereira, 1993; Araújo, 1996; Rodrigues & Dias Filho, 1996; Azevedo *et al.*, 2000; Strobel, 2003).

Os endófitos também podem atuar como agentes antidiabéticos (Strobel *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999; Wagenaar *et al.*, 2000), apresentando também ação antioxidante, a qual é de grande importância para a indústria de cosméticos (Strobel *et al.*, 2002). Cui *et al.*, (2011) observaram a inibição de linhagens de células cancerígenas por fungos endofíticos. Alguns desses organismos podem atuar como fontes para a produção de anticancerígenos naturais (Huang *et al.*, 2006).

2.3 Ocorrência de fungos endofíticos na família Arecaceae

Muitos trabalhos com fungos endofíticos têm sido realizados nas diversas famílias de vegetais, principalmente nas gramíneas e espécies de regiões tropicais. Estudos com fungos endofíticos

relacionados à hospedeiros da família Arecaceae ainda são escassos. Rodrigues & Samuels (1990) relataram, na Austrália, pela primeira vez a ocorrência de fungos endofíticos em palmeiras (Arecaceae), isolando fungos em folhas de *Licuala ramsayi* (Muell.) Domin. Rodrigues (1994) isolou fungos endofíticos de uma importante palmeira da amazonia conhecida popularmente como açai (*Euterpe oleracea* Mart.).

Southcott *et al.* (1997) isolaram fungos endofíticos de duas espécies de palmeiras *Livistona chinensis* Jacquin e *Sabal bermudana* Bailey (endêmica na ilha das Bermudas). Taylor *et al.*, (1999) compararam a micobiota endofítica de *Trachycarpus fortunei* (Hook.) H.Wendl., uma palmeira típica de regiões temperadas, dentro e fora do seu ambiente natural. Lumyong *et al.* (2009) isolaram fungos endofíticos de *Calamus kerrianus* Becc. e *Wallichia caryotoides* Roxb., ambos representantes da família Arecaceae. Identificação morfológica e molecular de fungos endofíticos foi realizada por Guo *et al.*, (2000) em folhas de *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. ex Mart. em Hong Kong, mostrando um passo importante nos estudos desses organismos em palmeiras.

Fungos endofíticos em palmeiras foram isolados de diferentes partes das nervuras, no tecido foliar entre as nervuras ou do pecíolo (Rodrigues, 1994; Taylor *et al.*, 1999). Fröhlich *et al.*, (2000) observaram diferenças entre a micobiota endofítica de diferentes tecidos e idades das folhas de palmeiras.

Uma importante discussão foi realizada por Fröhlich & Hyde (1999), onde foi levado em consideração que o número de espécies de fungos endofíticos (Ascomycota, Basidiomycota e anamórficos) que ocorrem em Arecaceae é grande seguindo a razão palmeira:fungos (1:26), mais elevada do que a razão geralmente aceita de 1:6 para outras plantas. Os autores sugerem que essa seria uma estimativa mais precisa da relação hospedeiro/fungo para palmeiras nos trópicos e que a estimativa realizada por Hawksworth (1991) de 1,5 milhões de espécies de fungos existentes no planeta seria muito conservadora.

Estudos que visam a aplicação de fungos endofíticos foram realizados por Gómez-Vidal *et al.*, (2006) que inocularam fungos entomopatogênicos em tecidos de *Phoenix dactylifera* L. e observaram que esses fungos foram capazes de sobreviver como endofíticos, podendo ser utilizados como biocontrole de pestes de palmeiras. Segundo Almeida *et al.*, (2005) espécies endofíticas de pupunha apresentam potencial para o uso no controle biológico de patógenos e podem ser utilizadas como agentes de controle biológico dos patógenos causadores do apodrecimento radicular de pupunheiras. Espécies de *Penicillium* endofíticos de *Mauritia flexuosa* L. da amazônia são produtores de alcalóides e outros metabólitos importantes (Koolen *et al.*, 2012).

No Brasil existem poucos registros de fungos endofíticos em Arecaceae. Freire (2005) relata a ocorrência de uma espécie em *Copernicia prunifera* (Miller) H.E. Moore conhecida popularmente como carnaúba no Ceará. Mariano *et al.*, (1997) realizaram um trabalho onde compararam a comunidade endofítica e epifítica de *Cocos nucifera* L. em Pernambuco, Sergipe e Alagoas.

2.4 *Cocos nucifera*

2.4.1 Origem e importância

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma espécie tropical, largamente distribuída na Ásia, África, America Latina e regiões do Pacífico (CGIAR, 2014) sendo cultivado em mais de 86 países (Persley, 1992). A verdadeira origem do coqueiro é bastante discutida. Acredita-se que o coqueiro seja originário do continente americano (Medina, 1980), no entanto a hipótese mais aceita é que seja originário do sudeste asiático mais especificamente na Malásia (Purseglove, 1972). No Brasil, o estado da Bahia é apontado como o local da primeira introdução do coqueiro gigante, feita pelos portugueses em 1553, a partir de mudas provenientes da Ilha de Cabo Verde (Gomes, 1984; Siqueira *et al.*, 1998).

O coqueiro é uma palmeira amplamente cultivada em todo o mundo, sendo considerada uma das mais importantes espécies tropicais utilizadas pelo homem. Seu cultivo pode ser considerado uma das mais importantes atividades agrícolas no mundo. A partir desta planta são conhecidos mais de 100 produtos ou subprodutos, gerando emprego e renda (Cuenca, 1998).

A cocoicultura no Brasil vem se destacando nos últimos anos. Em 1990 o país ocupava a 10ª posição no ranking mundial, com uma produção ao redor de 477 mil toneladas de coco. Atualmente, o país é o quarto maior produtor mundial, produzindo aproximadamente 2,8 milhões de toneladas, em uma área de 287 mil ha de coqueiros (Embrapa, 2011).

Apesar do cultivo do coqueiro estar sendo estimulado e introduzido em várias regiões do país, as maiores plantações e produções se concentram na faixa litorânea do Nordeste e parte da região Norte do Brasil. Nessas áreas o cultivo é favorecido pelas condições climáticas e ambas as regiões detêm cerca de 70% da produção do coco brasileiro (IBGE, 2009; Embrapa, 2011).

2.4.2 Classificação e caracterização das cultivares de coqueiro

O coqueiro pertence a família Arecaceae, uma das mais importantes famílias da classe monocotiledôneas, sendo o gênero constituído apenas pela espécie *Cocos nucifera* L. (Foale, 2005).

Apesar de apresentar uma única espécie para o gênero, *C. nucifera* é composta por algumas variedades, onde as duas mais importantes são: *Cocos nucifera* var. *typica*, conhecida no Brasil como “Gigante” e *Cocos nucifera* var. *nana*, denominada de “Anã”. A variedade Anã é composta das cultivares Verde, Amarela, Vermelha da Malásia e Vermelha de Camarões (Aragão *et al.*, 2002). Um terceiro tipo, o híbrido, é resultante de cruzamentos entre estas variedades (Aragão *et al.*, 1999).

Os híbridos resultam do cruzamento das variedades Anã e Gigante, e constituem um grupo de dupla finalidade, devido ao seu potencial de utilização tanto de forma *in natura* como no processamento industrial (Embrapa 2011). O híbrido PB -121, resultado do cruzamento entre as variedades Anão Amarelo da Malásia e Gigante do Oeste Africano, foi o primeiro híbrido desenvolvido e usado em escala comercial (Dallemele *et al.*, 2008).

O coqueiro gigante é uma planta de porte alto, atingindo cerca de 35m de altura, com produtividade de cerca de 60 a 80 frutos/planta/ano. O início da produção ocorre sete anos após o plantio e seus frutos são utilizados pela indústria de processamento na forma de coco ralado, leite de coco, óleo de coco, etc (Silva, 2002). O coqueiro anão é uma planta de porte baixo, atingindo cerca de 12 m de altura, com produtividade em torno de 200 a 250 frutos/planta/ano. O início da produção ocorre três anos após o plantio e seus frutos são utilizados na forma de coco “verde”. Os híbridos são plantas de porte intermediário, atingindo cerca de 20 m de altura, com produtividade ao redor de 120 a 150 frutos/planta/ano. O início da produção ocorre quatro anos após o plantio e seus frutos são utilizados tanto na indústria de processamento quanto na forma de coco “verde” (Silva, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de coleta

As coletas das folhas foram efetuadas na Unidade de Execução de Pesquisa de Itapirema (UEP), pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), no Município de Goiana, PE, tendo como coordenadas 7°33'45" S - 35°0'0" W e altitude de 14 m.

3.2. Coleta do Material

Durante o período de Maio/2012 a Abril/2013 (Tabela 1), foram realizadas seis coletas, sendo três no período de estiagem e três no período chuvoso.

As coletas foram realizadas em três áreas, sendo cada área correspondente a uma cultivar: 1. Anão amarelo (Figura 1), 2. Anão verde (Figura 2) e 3. híbrido PB121 (Figura 3). Para cada área três pontos foram determinados aleatoriamente.

Para cada ponto foram escolhidos três espécimes de cada vegetal, sem sintomas aparentes de doenças ou injúrias, sendo coletadas para o estudo, três folhas sadias de cada espécime. No total, foram obtidas 27 folhas por área, sendo 81 por coleta. As folhas foram transportadas ao Laboratório de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, para manipulação, no tempo máximo de 24 horas. As folhas de cada ponto foram misturadas formando uma amostra composta. Para cada ponto foram plaqueados 18 discos de folíolo e 6 de raque. No total foram obtidos 1296 discos para o estudo.



Figura 1. *Cocos nucifera* cultivar Anão verde em, Goiana, Pernambuco.



Figura 2. *Cocos nucifera* cultivar Anão amarelo, Goiana, Pernambuco.



Figura 3. *Cocos nucifera* Híbrido PB121, Goiana, Pernambuco.

Tabela 1. Características climáticas da área de coleta das folhas de *Cocos nucifera* em Goiana, Pernambuco.

Coleta (mês/ano)	Período	Densidade Pluviométrica (mm)
Maio/2012	Chuvoso	125,8
Junho/2012	Chuvoso	241,3
Dezembro/2012	Estiagem	23,7
Janeiro/2013	Estiagem	78,6
Fevereiro/2013	Estiagem	70,5
Abril/2013	Chuvoso	212,1

Fonte: Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA)

3.3 Isolamento e identificação dos Fungos Endofíticos

As folhas coletadas foram lavadas com água corrente e detergente neutro, fragmentadas em discos foliares de 6mm de diâmetro e desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 2 minutos e 30 e novamente em álcool 70% por 30 segundos para retirada do excesso de hipoclorito. Em seguida o material foi lavado com água destilada esterilizada (Pereira *et al.*, 1993, modificado).

As folhas de cada ponto foram misturadas formando uma amostra composta sendo plaqueados 18 discos de folíolo e 6 fragmentos de raque. No total foram obtidos 1296 discos e fragmentos para o estudo. Seis discos das folhas e seis fragmentos de raque foram transferidos para placas de Petri, em triplicata, contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (50mg/L^{-1}), incubados em temperatura ambiente ($28\pm 2^\circ\text{C}$) e observados diariamente por até 15 dias quanto ao desenvolvimento das colônias fúngicas ao redor do disco. Para o controle da assepsia, 50µL da água utilizada foram plaqueados em BDA como comprovação da desinfestação superficial (Pereira *et al.*, 1993).

Pequenos fragmentos de micélio das colônias formadas foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA para crescimento do fungo e posterior identificação (Souza *et al.*, 2004). A identificação das espécies foi baseada em características macro e microestruturais com

base na literatura especializada (Ellis, 1971; Ellis, 1976; Sutton, 1980; Domsch *et al.*, 1993; Kirk & Cooper, 2005).

3.4. Diversidade

A diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J') foram determinadas utilizando-se o programa Primer (Clarke & Gorley, 2006).

3.5. Análise estatística

Curvas de acumulação de espécies também foram calculadas para cada área, o que permitiu estimar a riqueza total de cada área a partir de estimativas como Chao e Jackknife. Para essas análises multivariadas foi utilizado o programa Primer (Clarke & Gorley, 2006).

3.6. Frequência de ocorrência

Durante o período de estudo, a frequência de ocorrência das espécies fúngicas foi calculada (Lobo & Leighton, 1986), sendo expressa em termos percentuais nas seguintes classes: muito frequente: $\geq 75,5\%$; frequente: $< 75, 5\% \geq 51\%$; pouco frequente: $< 51\% \geq 25\%$; esporádica: $< 25\% \geq 12,5\%$; rara: $< 12,5\%$, e calculada pela seguinte fórmula:

$$F = P \times 100 / p$$

Onde: F = frequência de ocorrência de espécies fúngicas.

P = nº de fragmentos foliares com crescimento fúngico

p = nº total de fragmentos foliares

3.7. Similaridade

Para o cálculo da similaridade dos fungos endofíticos isolados entre as áreas de estudo foi utilizado o Coeficiente de Similaridade de Sorensen (1948):

$$S_s = (2w/a + b + c) \times 100$$

Onde: w = nº de espécies comuns as três cultivares;

a = nº total de espécies ocorrentes anão-amarelo;

b = nº total de espécies ocorrentes anão-verde;

c = nº total de espécies ocorrentes PB 121.

3.8. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

A biomassa foi obtida a partir de fungos cultivados em Sabouraud sólido contido em tubos de ensaio, mantidos a 28°C por até seis dias. Todo micélio foi retirado do tubo de ensaio com o auxílio de uma alça de platina, sendo o material transferido para microtubos de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de 0,5g de contas de vidro (glass beads) com dois diâmetros diferentes na proporção de 1:1 (acid-washed, 150-212µm and 425-600µm; Sigma, U.S. sieve). O material foi triturado por agitação em alta velocidade em um FastPrep.

A extração do DNA genômico foi realizada, com o material previamente triturado, conforme Góes-Neto *et al.* (2005), que inclui uma lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e posterior homogeneização do material em tampão CTAB 2%, além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura.

Para amplificação da região ITS foram utilizados os *primers* ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram os mesmos descritos por Kaliyaperumal & Kalaichelvan (2008). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações.

Os produtos das extrações de DNA e das reações de PCR (5 µL) foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed®, e visualizado sob luz UV. Os produtos de amplificação foram purificados com o “PureLink PCR Purification Kit” (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, e encaminhados para a plataforma de sequenciamento do Laboratório Central da UFPE.

3.9. Análise Filogenética

As seqüências obtidas foram alinhadas com outras recuperadas do GenBank com o auxílio do programa Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) e editadas usando o programa BioEdit (Hall, 1999).

Antes da análise filogenética, o modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado utilizando Topali 2.5 (Milne *et al.*, 2004). A caracterização molecular final foi realizada com a avaliação filogenética e construção de árvores Bayesiana e de máxima verossimilhança em MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) e PhyML (Guindon e Gascuel, 2003) respectivamente, executados a partir do programa Topali 2,5.

4. RESULTADOS

4.1. Diversidade de fungos endofíticos em *Cocos nucifera*

Nos fragmentos de folhas/raques analisados (1296) foram encontrados 474 espécimes de fungos endofíticos, distribuídos em 33 espécies pertencentes a 31 gêneros (Tabela 2). As espécies mais comuns foram *Nigrospora oryzae*, *Pestalotiopsis microspora* e *Stenella musae*. A maioria dos táxons ocorreu raramente ($fr < 10$), muitas deles sendo encontrados apenas uma vez. Embora a maior parte das espécies sejam representantes do filo Ascomycota, *Occultifur externus*, *Radulidium apiculatum*, *Rhodotorula marina* e *Pseudozyma hubeiensis* são anamorfos do filo Basidiomycota e *Syncephalastrum racemosum* ao filo Zygomycota.

Tabela 2. Frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos isolados de *Cocos nucifera* em duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e um híbrido (PB121) em Goiana, Pernambuco.

Fungos endofíticos	Folha	Anão amarelo	Anão verde	PB 121	f	fr
<i>Acremonium strictum</i> W. Gams (= <i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb.)	F	0	3	2	5	1,05 ^r
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	F	0	0	2	2	0,42 ^r
<i>Arthrimum xenocordella</i> Crous	F	0	1	0	1	0,21 ^r
<i>Ascotricha guamensis</i> L.M. Ames	F	0	2	2	4	0,84 ^r
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	F;P	3	0	0	3	0,63 ^r
<i>Cercospora apii</i> Fresen.	F	0	1	0	1	0,21 ^r
<i>Chaetomium pilosum</i> C. Booth & Shipton	P	0	0	2	2	0,42 ^r
<i>Cladosporium cladosporioides</i> Complexo	F;P	0	3	3	6	1,26 ^r
<i>Cladosporium dominicanum</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.	F	0	0	1	1	0,21 ^r
<i>Curvularia geniculata</i> (Tracy & Earle) Boedijn (= <i>Cochliobolus geniculatus</i> R.R. Nelson)	F	1	3	0	4	0,84 ^r
<i>Diaporthe arengae</i> R.R. Gomes, C. Glienke & P.W. Crous	F	1	0	0	1	0,21 ^r
<i>Diaporthe endophytica</i> R.R. Gomes, C. Glienke & P.W. Crous	F	0	0	3	3	0,63 ^r
<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg	F	0	1	0	1	0,21 ^r

Tabela 2. Continuação.

Fungos endofíticos	Folha	Anão amarelo	Anão verde	PB 121	f	fr
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. (= <i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman)	F	1	1	3	5	1,05 ^r
<i>Guignardia mangiferae</i> A.J. Roy (= <i>Phyllosticta capitalensis</i> Henn.)	F	0	0	2	2	0,42 ^r
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.	P	0	1	5	6	1,26 ^r
<i>Lecythophora</i> sp.	P	0	2	0	2	0,42 ^r
<i>Nectria pseudotrichia</i> Berk. & M.A. Curtis	F	0	0	1	1	0,21 ^r
<i>Neosartorya hiratsuka</i> Udagawa, Tsub. & Y. Horie	P	2	0	0	2	0,42 ^r
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch (= <i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds.)	F;P	24	49	56	129	27,21 ^{pf}
<i>Occultifur externus</i> J.P. Samp., R. Bauer & Oberw.	F	1	0	0	1	0,21 ^r
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson (= <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson)	F	4	0	0	4	0,84 ^r
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	F	0	7	0	7	1,47 ^r
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	F	8	2	3	13	2,74 ^r
<i>Pestalotiopsis microspora</i> (Speg.) Bat. & Peres	F;P	35	16	25	76	16,03 ^e
<i>Phlyctaeniella</i> sp.	F	0	0	1	1	0,21 ^r
<i>Phomopsis anacardii</i> Early & Punith. (= <i>Diaporthe anacardii</i> (Early & Punith.) R.R. Gomes, C. Glienke & P.W. Crous)	F	0	0	2	2	0,42 ^r
<i>Phomopsis</i> sp. Sacc. & Roum. (= <i>Diaporthe</i> Nitschke)	F	0	0	1	1	0,21 ^r
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> F.Y. Bai & Q.M. Wang	F	1	5	0	6	1,26 ^r
<i>Pyrenochaetopsis decipiens</i> (Marchal) Gruyter, Aveskamp & Verkley	F	1	0	0	1	0,21 ^r
<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i> (Sacc. & Briard) Gruyter, Aveskamp & Verkley	F	1	0	2	3	0,63 ^r
<i>Ramichloridium apiculatum</i> (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) de Hoog (= <i>Radulidium subulatum</i> (de Hoog) Arzanlou, W. Gams & Crous)	F	0	1	0	1	0,21 ^r

Tabela 2. Continuação.

Fungos endofíticos	Folha	Anão amarelo	Anão verde	PB 121	f	fr
<i>Rhodotorula marina</i> Phaff, Mrak & O.B. Williams	F	0	0	1	1	0,21 ^r
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	F;P	7	3	19	29	6,11 ^r
<i>Stenella musae</i> Arzanlou & Crous (= <i>Zasmidium musae</i> (Arzanlou & Crous) Crous & U. Braun)	F;P	70	36	38	144	30,37 ^{pf}
<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex J. Schröt.	F	0	0	1	1	0,21 ^r
<i>Xylaria</i> sp.	F	1	0	0	1	0,21 ^r
Total					474	

(F) espécies ocorrentes em folíolo; (P) espécies ocorrentes em raque; (^{pf}) espécies pouco frequentes; (^e) espécies esporádicas; (^r) espécies raras.

Das 37 espécies encontradas, 27 ocorreram apenas em folíolo, quatro apenas no raque e seis foram comuns em raque e folíolo (Tabela 2). Todas as espécies que ocorreram apenas no raque foram consideradas raras. Nenhuma das espécies foram consideradas muito frequentes ou frequentes. Apenas *Stenella musae* e *Nigrospora oryzae* foram consideradas pouco frequentes e *Pestalotiopsis microspora* como esporádica. Todas as outras espécies foram consideradas raras (Tabela 2).

4.2. Diversidade de fungos endofíticos por cultivar

Maior número de isolados e espécies ocorreu no híbrido PB121. A cultivar “anão verde” apresentou maior número de espécies quando comparado ao “anão amarelo”, no entanto ocorreu o inverso com relação ao número de isolados (Tabela 3). Os índices de diversidade de Shannon e Margalef foram maiores no híbrido PB121 seguido da cultivar “Anão verde” e “Anão amarelo”.

Sete espécies ocorreram exclusivamente na cultivar anão amarelo, enquanto cinco ocorreram apenas no anão verde e 10 no híbrido PB121 (Tabela 2).

Tabela 3. Riqueza de espécies (S), número de isolados (N), índices de diversidade de Shannon (H') e Margalef (D) e dominância de Pielou (J') em duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e um híbrido PB 121 de *Cocos nucifera*.

Hospedeiro	S	N	H'	D	J'
Anão amarelo	15	160	1,709	2,759	0,6311
Anão verde	18	137	1,978	3,455	0,6843
PB121	22	175	2,131	4,066	0,6893

A similaridade entre as duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e o híbrido (PB121) foi de 21,81%. O dendrograma gerado a partir da similaridade entre as cultivares e o híbrido mostrou que a cultivar Anão verde agrupou-se mais próximo do híbrido PB121 (Figura 4).

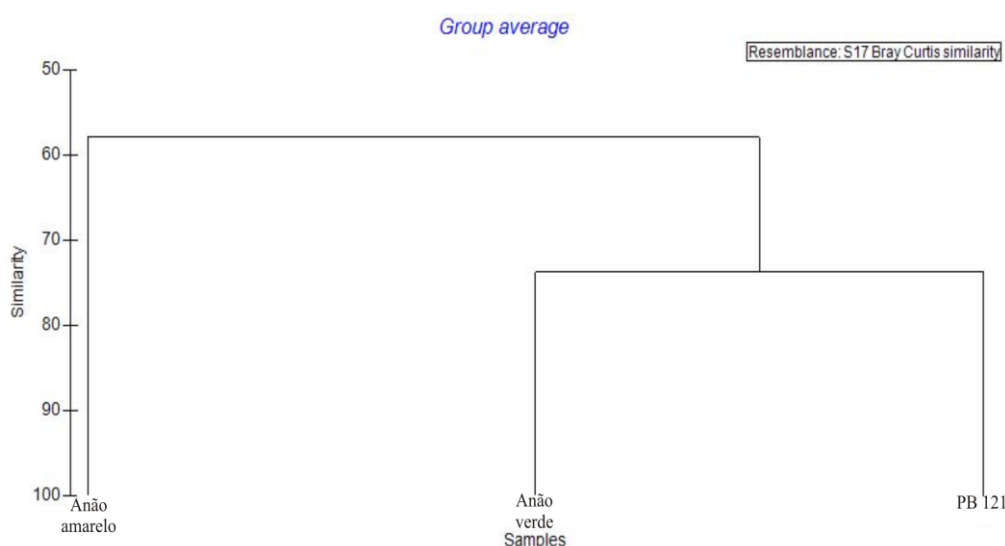


Figura 4. Similariadade de fungos endofíticos isolados de *Cocos nucifera* em duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e um híbrido (PB121) em Goiana, Pernambuco.

De acordo com a estimativa do índice Jackknife, a riqueza de espécies amostradas da cultivar anão amarelo foi de 60% (Figura 5), 73% para o anão verde (Figura 6) e 50% para o híbrido PB121 (Figura 7).

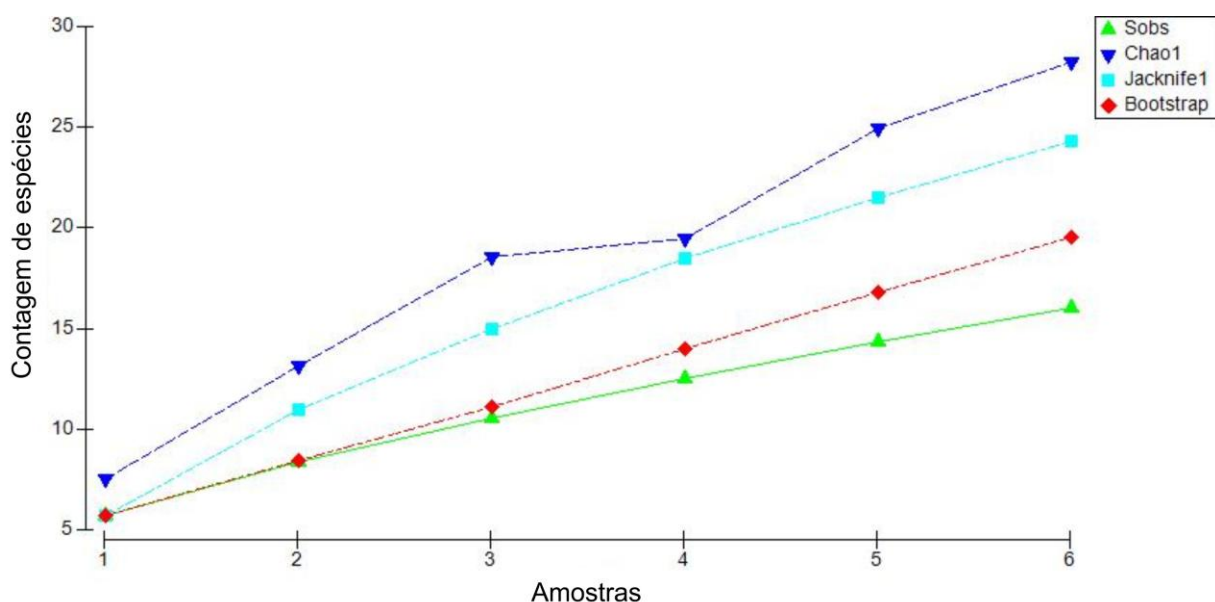


Figura 5. Curva de acumulação de espécies de fungos endofíticos (Sob) e de estimativa de riqueza pelo índice Chao (Chao 1), Jacknife (Jacknife 1) e Bootstrap para a cultivar anão amarelo.

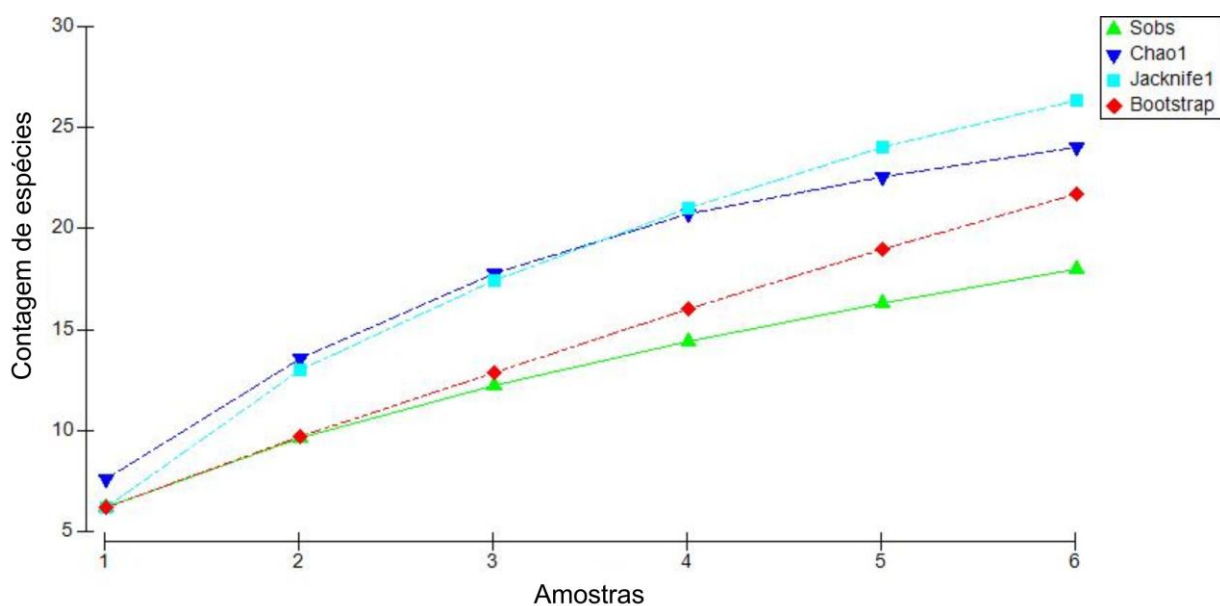


Figura 6. Curva de acumulação de espécies fungos endofíticos (Sob) e de estimativa de riqueza pelo índice Chao (Chao 1), Jacknife (Jacknife 1) e Bootstrap para a cultivar anão verde.

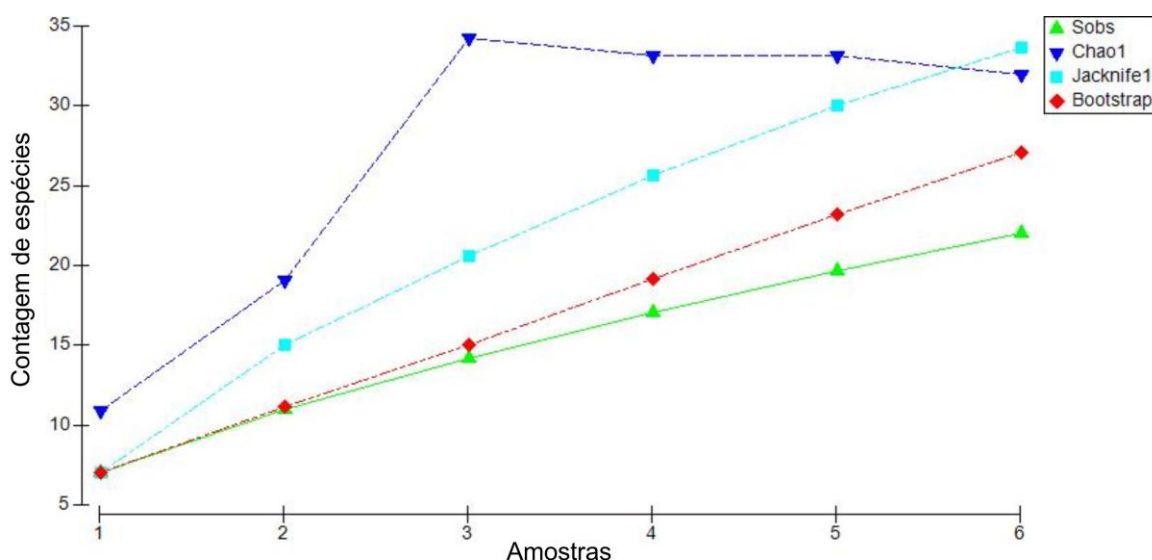


Figura 7. Curva de acumulação de espécies fungos endofíticos (Sob) e de estimativa de riqueza pelo índice Chao (Chao 1), Jackknife (Jackknife 1) e Bootstrap para o híbrido PB121.

4.3. Diversidade de fungos endofíticos por período de coleta

Apesar de ter sido observado maior número de isolados no período de estiagem, essa diferença não foi significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Riqueza de espécies (S), número de indivíduos (N), índices de diversidade de Shannon (H') e Margalef (D) e dominância de Pielou (J') em duas cultivares e um híbrido de *Cocos nucifera* nos períodos de estiagem e chuvoso.

Períodos	S	N	H'	D	J'
Estiagem	25	222	2,097	4,442	0,6513
Chuvoso	26	199	2,055	4,723	0,6307

4.4. Análise molecular dos fungos endofíticos

Com exceção das espécies *Chaetomium pilosum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Syncephalastrum racemosum* e *Xilaria* sp., representantes de todas as espécies de fungos endofíticos isolados de *Cocos nucifera* foram sequenciadas as regiões ITS do rDNA, sendo realizada busca por máxima identidade no programa Blastn do NCBI. A maioria das sequências geradas mostrou similaridade igual ou superior a 99% com sequências presentes no banco de dados, no entanto os isolados AV23, PB60, AA71 e AA36 mostraram identidade inferior a 99% (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação morfológica e molecular de fungos endofíticos isolados de *Cocos nucifera* em duas cultivares (Anão amarelo e Anão verde) e um híbrido (PB121), coletados em Goiana, Pernambuco.

Identificação Morfológica	Blastn (%)	Isolados estudados	Identificação molecular
<i>Arthrinium xenocordella</i>	97	Isolado AV23	<i>Arthrinium xenocordella</i>
<i>Ascotricha guamensis</i>	99	IsoladoAA8	<i>Hansfordia sinuosae</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	99	IsoladoAV50	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Chaetomium pilosum</i>	-	IsoladoPBP25	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> Complexo	99	IsoladoAA90	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
<i>Cladosporium dominicanum</i>	99	IsoladoAA7	<i>Cladosporium dominicanum</i>
<i>Curvularia geniculata</i>	99	IsoladoAV27	<i>Cochliobolus geniculatus</i>
<i>Fusarium proliferatum</i>	99	Isolado AV58	<i>Fusarium proliferatum</i>
<i>Fusarium solani</i>	99	IsoladoAV46	<i>Fusarium solani</i>
<i>Guignardia</i> sp.	99	IsoladoAA118	<i>Guignardia mangiferae</i>
<i>Nigrospora oryzae</i>	99	IsoladoAV50	<i>Nigrospora oryzae</i>
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	-	IsoladoAAP9	
<i>Lecythophora</i> sp.	99	IsoladoAVP12	<i>Lecythophora</i> aff. <i>decumbens</i>
Levedura sp1.	99	Isolado AA62	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
Levedura sp2.	99	IsoladoAA45	<i>Rhodotorula marina</i>
Levedura sp3.	99	Isolado AA94	<i>Occultifur externus</i>
<i>Mycelia sterilia</i> 1	99	IsoladoAA89	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Mycelia sterilia</i> 2	99	IsoladoAV125	<i>Cercospora apii</i>
<i>Nectria pseudotrichia</i>	99	IsoladoPB25	<i>Nectria pseudotrichia</i>
<i>Neosartorya hiratsuka</i>	100	IsoladoPBP14	<i>Neosartorya hiratsuka</i>
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	95	IsoladoAV34	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
<i>Penicillium citrinum</i>	99	IsoladoPB38	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99	IsoladoPB21	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
<i>Phlyctaeniella</i> sp.	97	IsoladoAA36	Ascomycota sp.
<i>Phomopsis</i> sp1.	98	IsoladoAA71	<i>Diaporthe anacardii</i>
<i>Phomopsis</i> sp2.	99	IsoladoPB83	<i>Diaporthe arengae</i>
<i>Phomopsis</i> sp3.	99	IsoladoPB80	<i>Diaporthe endophytica</i>
<i>Phomopsis</i> sp4.	97	IsoladoPB60	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	99	IsoladoPB41	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
<i>Pyrenochaetopsis decipiens</i>	99	IsoladoPB56	<i>Pyrenochaetopsis decipiens</i>
<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>	99	IsoladoPB147	<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>
<i>Ramichloridium apiculatum</i>	99	IsoladoAV58	<i>Ramichloridium apiculatum</i>
<i>Sarocladium strictum</i>	99	IsoladoAA80	<i>Sarocladium strictum</i>
<i>Sordaria fimicola</i>	99	IsoladoAAP6	<i>Sordaria fimicola</i>
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	-	IsoladoAA26	
<i>Xylaria</i> sp.	-	IsoladoPB82	
<i>Stenella musae</i>	99	IsoladoPB167	<i>Stenella musae</i>

Foi construída uma árvore filogenética com todas as sequências provenientes dos isolados de fungos endofíticos pertencentes a classe Sordariomycetes (Figura 8). Isolados de Hipocreales (Figura 8) agruparam-se com alto valor de suporte e a identificação morfológica foi confirmada pelos dados moleculares. Os isolados AV46 e PB148 identificados como *Fusarium solani*, agruparam-se com outras sequências, pertencentes a essa espécie, com alto valor de suporte. O mesmo ocorreu com o isolado AV58 que agrupou-se com *F. proliferatum*. Os isolados PB25 (*Nectria pseudotrichia*), PB41 (*Purpureocilium lilacinum*), AV22 e AA80 (*Sarocladium strictum*) também foram confirmados molecularmente (Tabela 5 e Figura 8).

Com relação a ordem Diaphortales, foram encontrados apenas representantes do gênero *Diaporthe* (Figura 8). Morfologicamente, esses indivíduos haviam sido identificados apenas em nível genérico do anamorfo (*Phomopsis*), sendo necessária a análise molecular para a caracterização em nível específico. Alguns isolados apresentaram alto percentual de identidade no Blastn e forte agrupamento nas análises filogenéticas com espécies depositadas no banco de dados, o que permitiu a identificação da maioria deles em nível específico. Os isolados PB83, AA71, AA83 e PB 80 agruparam-se com *Diaporthe arengae*, *D. anacardii*, *D. endophytica* e *D. endophytica*, respectivamente. Já os indivíduos PB60 e AV57 formaram um clado separado na análise filogenética (Figura 8), sendo mantidos como *Diaporthe* sp.

As ordens Sordariales e Coniochaetales foram representadas por dois isolados (Figura 8). O isolado PB 147 foi identificado morfolologicamente como *Sordaria fimicola*, apresentando alto percentual de identidade máxima com sequências dessa espécie depositadas no NCBI (Tabela 5) e agrupando-se filogeneticamente com outras sequências de *S. fimicola*. Embora o clado ao qual esse indivíduo pertence também apresente uma sequência de *S. humana*, o isolado em questão foi considerado como *S. fimicola* com base em observações morfológicas. Não foi possível identificar morfolologicamente e molecularmente o isolado AVP12, mesmo em nível genérico ainda não está claro a qual grupo o mesmo pertence.

Três isolados agruparam-se com outros membros da ordem Xylariales (Figura 8). O isolado AA8 agrupou-se com altos valores de suporte com *Hasnfordia sinuosae*. Já o isolado AV23 formou um clado com *Arthrimum xenocordella* (Figura 8). O isolado PB21 pertence a espécie *Pestalotiopsis microspora*.

A sequência do isolado AV50 agrupa-se fortemente com *Nigrospora oryzae* espécie pertencente a ordem Trichosphaeriales (Figura 8).

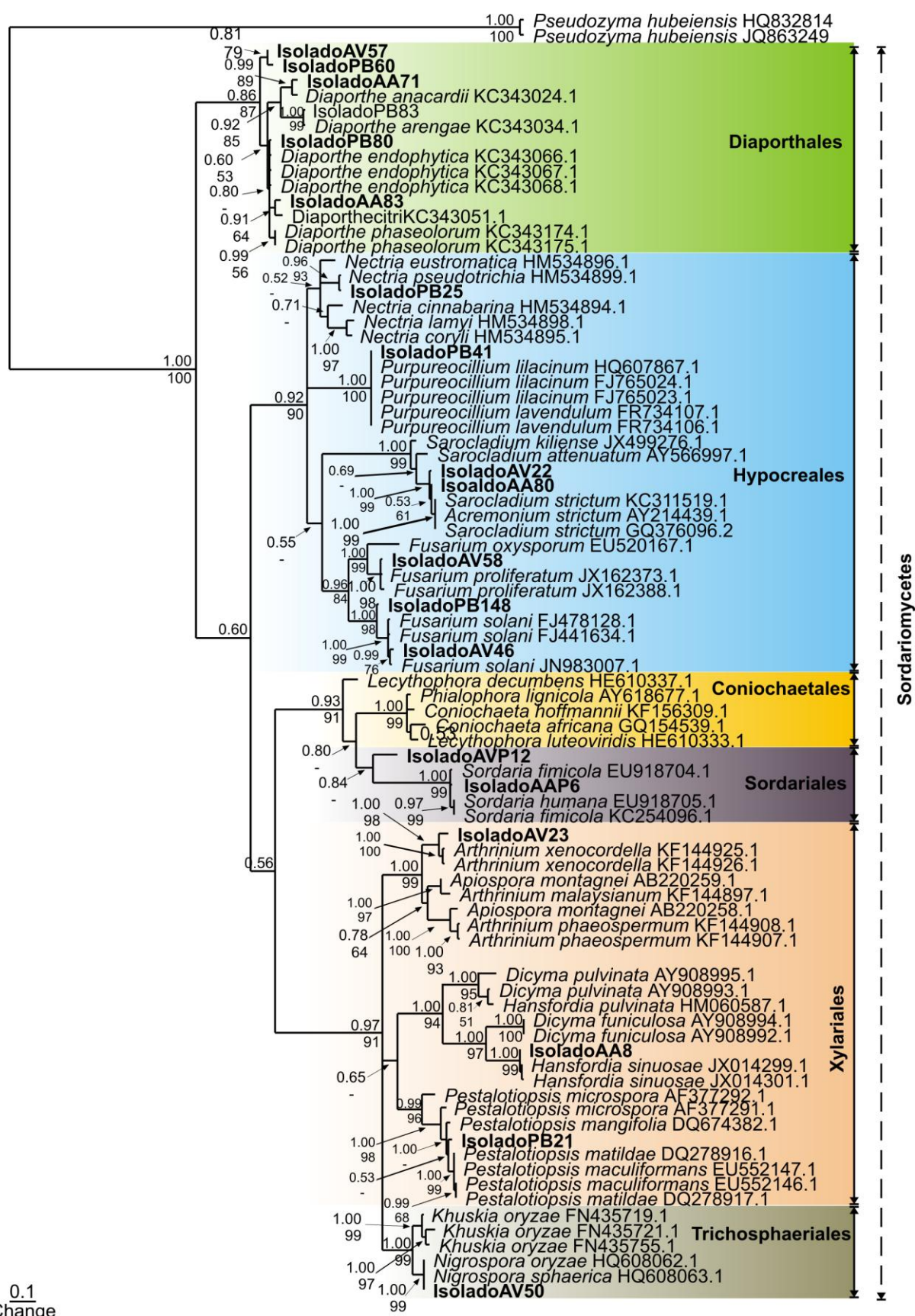


Figura 8. Filograma obtido a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento das espécies isoladas como endófitos de *Cocos nucifera* pertencentes a classe Sordariomycetes. Valores de suporte são de análise bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.

Também foi construída uma árvore com as sequências provenientes dos isolados dos fungos endofíticos de *Cocos nucifera* pertencentes as classes Dothideomycetes e Eurotiomycetes (Figura 9). A classe Eurotiomycetes foi representada por dois isolados. PBP14 agrupou-se com sequências de *Neosartorya hiratsuka*, tendo valor percentual de identidade de 100% com esse fungo (Tabela 5). A identificação morfológica também confirmou a espécie. Já o isolado PB38 não foi identificado em nível específico, porém ficou agrupado com *Penicillium griseofulvum* e *P. citrinum*.

Vinte e um isolados pertencem a classe Dothideomycetes, sendo distribuídos nas ordens Botryosphaerales, Capnodiales, Dothideales e Pleosporales (Figura 9). O Isolado AV50 foi identificado morfológicamente e molecularmente como *Aureobasidium pullulans* (Dothideales). Apenas um indivíduo da ordem Botryosphaerales foi isolado (AA118) que foi identificado morfológicamente apenas em nível genérico como *Guignardia*. Entretanto, os dados moleculares mostraram que a sequência desse fungo apresentou 99% de identidade com *Guignardia mangifera*, sendo agrupado filogeneticamente com essa espécie.

Morfológicamente não foi possível distinguir, em nível específico, os morfotipos dos isolados de *Cladosporium*. As sequências geradas nesse estudo demonstram que os indivíduos desse gênero encontrados como endófitos pertencem ao complexo Cladosporioides, com exceção do isolado AV7 que apresentou 99% de identidade com sequências de *C. dominicanum*, formando um clado distinto fortemente suportado (Figura 9). Além de *Cladosporium*, outros três gêneros da ordem Capnodiales ocorreram como endofítico em *Cocos nucifera*. Os isolados PB167 e PB162 apresentaram 99% de identidade com sequências de *Stenella musae* depositadas no GenBank (Tabela 5), formando um clado bem suportado com essa espécie. A sequência do isolado AV58 foi identificada como pertencente a *Ramichloridium apiculatum* (99% de identidade). O isolado AV125 não esporulou em meio de cultura permanecendo como *Mycelia sterilia*. Entretanto, as sequências desse fungo apresentaram 99% de identidade com sequências de *Cercospora apii* depositadas no Genbank, no entanto nas análises filogenéticas o isolado AV125 formou um clados com *C. apii*, *C. abicola* e *C. beticola*.

O isolado AV34 não foi identificado em nível específico, mostrando identidade máxima de 95% com sequências de *Paraconiothyrium* depositadas no GenBank. Na análise filogenética a sequência do isolado em questão não agrupou com nenhuma outra sequência. O isolado AV36 foi identificado morfológicamente como *Phlyctaeniella* sp., entretanto não agrupou com nenhum gênero na árvore e nem mostrou percentual de identidade significativo com grupos específicos de Pleosporales.

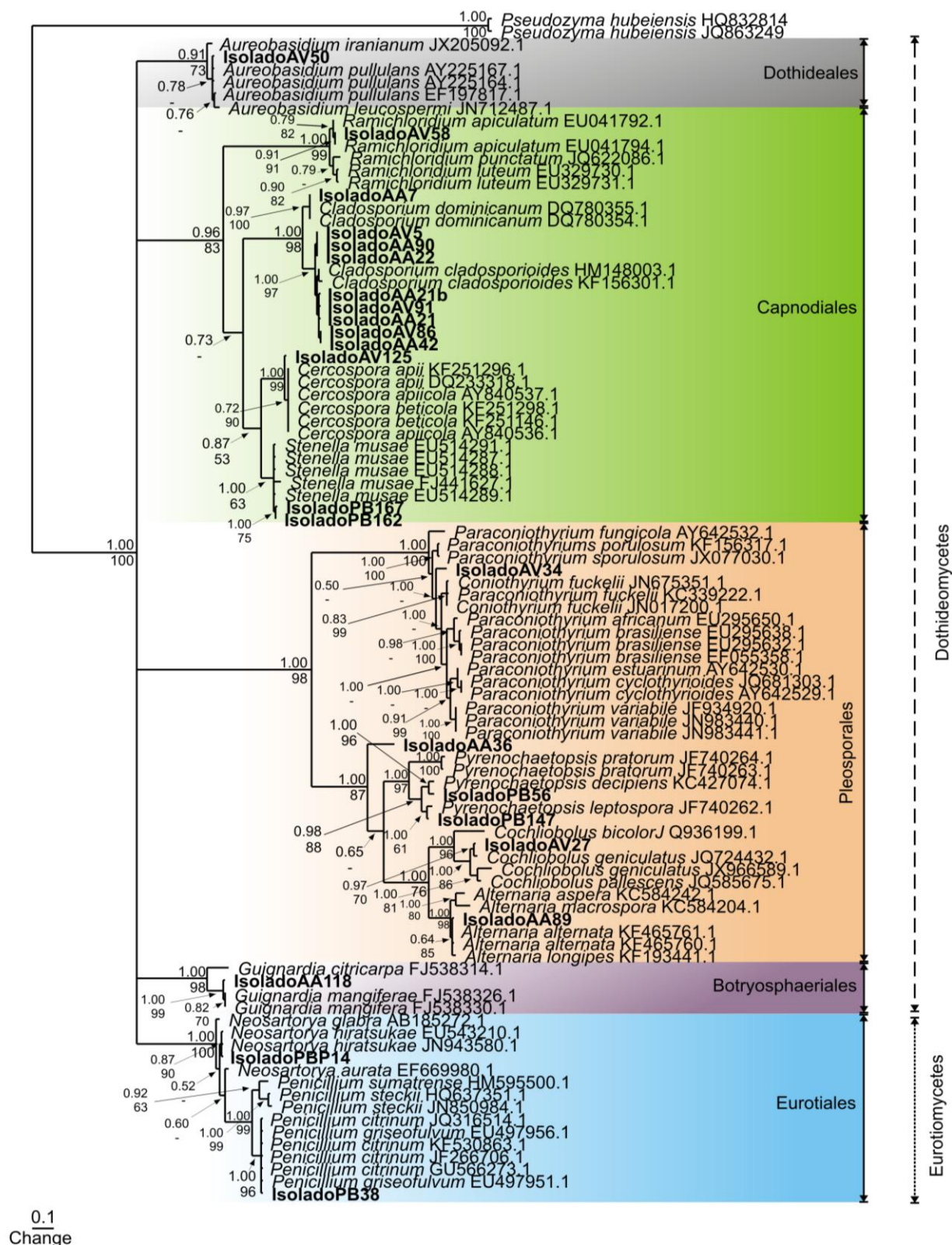


Figura 9. Filograma obtido a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento das espécies isoladas como endófitos de *Cocos nucifera* pertencentes às classes Dothideomycetes e Eurotiomycetes. Valores de suporte são de análise Bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.

Apesar da maioria das espécies de fungos endofíticos encontrados em *C. nucifera* nesse estudo pertecerem ao filo Ascomycota, três espécies são anamorfos do filo Basidiomycota (leveduras), identificadas apenas com base molecular. As sequências do isolado AA94 mostraram alto percentual de identidade (100%BY e 95%ML) com sequências de *Occultifur externus*. A sequência de AA94 também formou um clado com altos valores de suporte com *O. externus* (Figura 10). Os isolados AA45, AA62 e AA64 apresentaram alto percentual de identidade (99%BY e 98%ML), agrupando-se filogeneticamente com *Rhodotorula marina*, *Pseudozyma hubeiensis* e *P. hubeiensis*, respectivamente (Figuras 10 e 11).

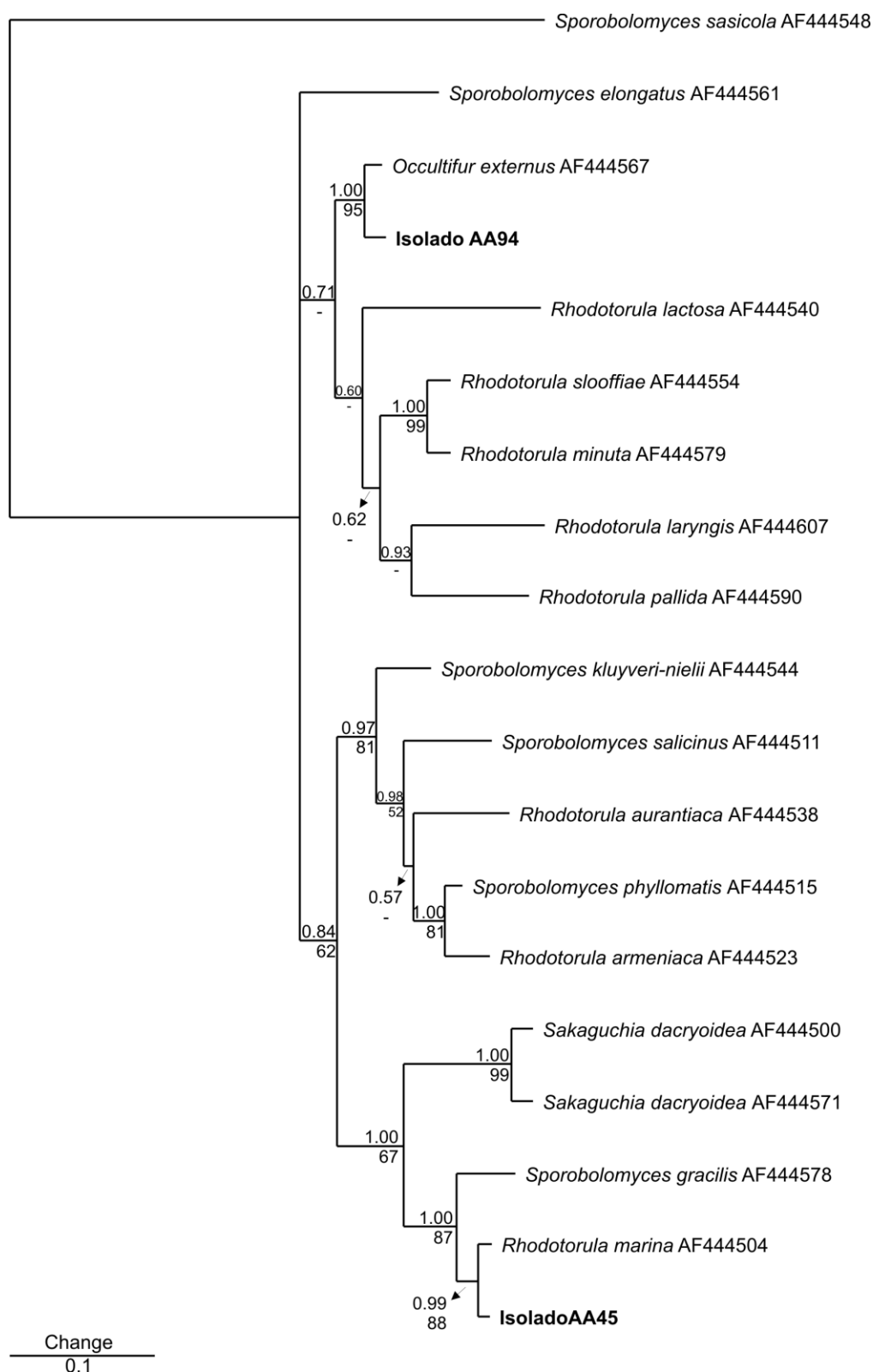


Figura 10. Filograma obtido a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento das espécies *Occultifur externus* e *Rhodotorula marina*, isoladas como endófitos de *C. nucifera*. Valores de suporte são de análise bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.

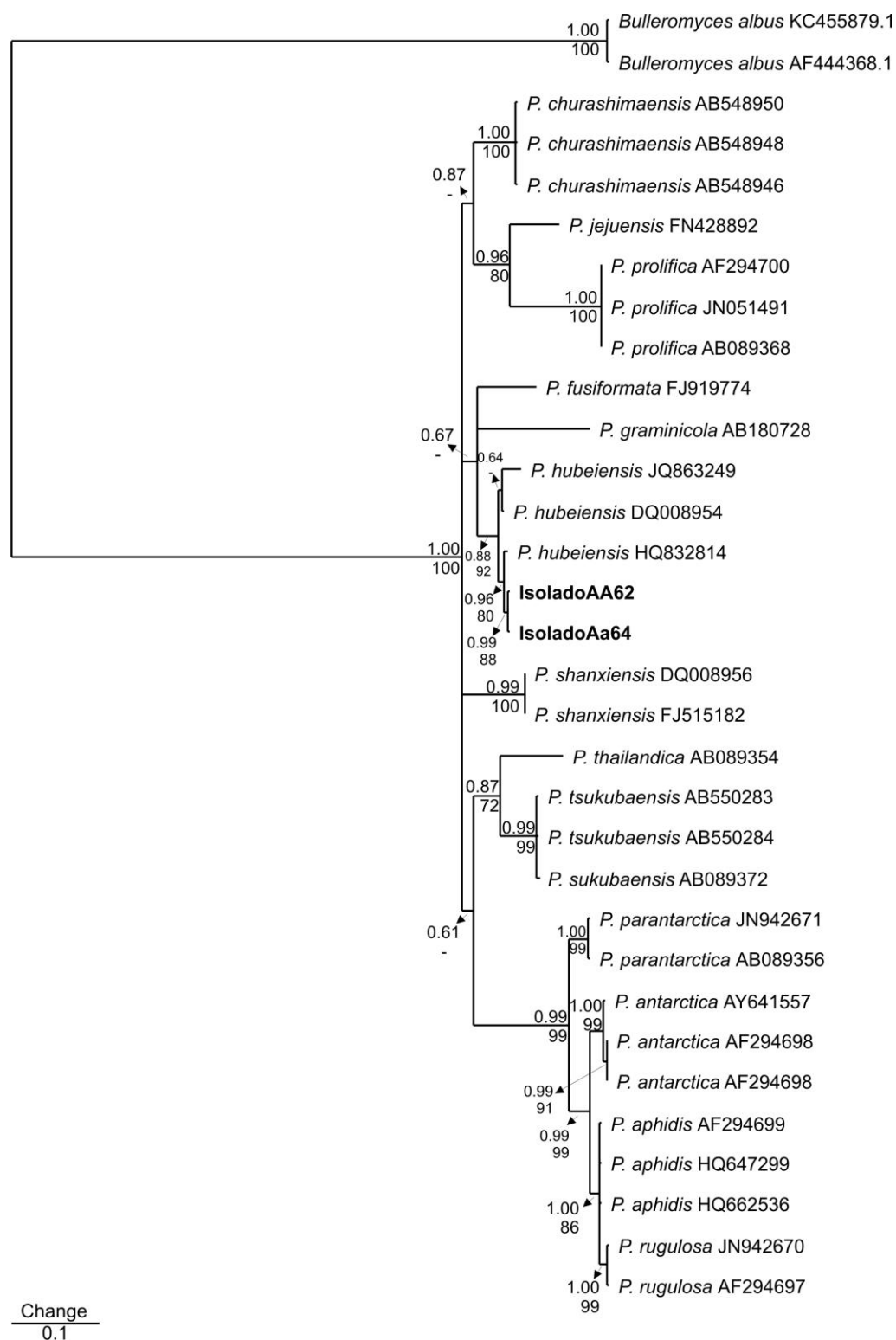


Figura 11. Filograma obtido a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento da espécie *Pseudozyma hubeiensis*, isolada como endófito de *C. nucifera*. Valores de suporte são de análise bayesiana e máxima verossimilhança, respectivamente. Sequências obtidas nesse estudo são mostradas em negrito.

5. DISCUSSÃO

Do total de 1296 fragmentos de folhas e raques semeados, 474 apresentaram crescimento de fungos endofíticos o que representa uma frequência de isolamento de 36,5%. Rodrigues (1994) isolando fungos endofíticos de *Euterpe oleracea* Mart. (açai), obteve 21 a 30% de frequência de isolamento. Rodrigues & Samuels (1990) isolaram fungos endofíticos em palmeiras tropicais e obtiveram crescimento em 75 dos 597 discos semeados com uma frequência de 12,5%. Southcott & Johnson (1997) obtiveram uma frequência de 20,3% em duas espécies de palmeiras (*Sabal bermudana* L.H.Bailey e *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. ex Mart. Taylor *et al.*, (1999) e Lumyong *et al.*, (2009) obtiveram valores maiores como 60,9% e 68,7% de frequência no isolamento de fungos endofíticos de *Trachycarpus fortunei*, *Calamus kerrianus* e *Wallichia caryotoides*.

Raques são sempre menos colonizados do que a folha (Sahashi *et al.*, 1999), entretanto Vujanovic & Brisson (2002) observaram maior colonização na raque em relação a folha. Em estudos com palmeiras foi observada preferência de algumas espécies por habitarem raques e outras por habitarem as folhas (Frohlich *et al.*, 2000; Lumyong *et al.*, 2009). Este trabalho representa o primeiro relato da avaliação da comunidade endofítica em raque de *Cocos nucifera*, no entanto não foi possível comparar estatisticamente a preferência dos isolados em relação a raque e o folíolo, devido a metodologia de coleta. O fato é que algumas espécies ocorreram apenas em folíolo e outras apenas em raque o que demonstra que possivelmente existe preferência de algumas espécies por determinada parte da folha do hospedeiro.

Muitos trabalhos retratam a preferência de fungos endofíticos por determinadas espécies hospedeiras (Rodrigues & Samuels 1990; Frohlich *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2001; Ananda & Sridhar 2002), mas pouco se sabe sobre preferências entre cultivares de uma mesma espécie hospedeira. Nesse estudo observamos que muitos táxons de fungos endofíticos foram específicos para determinada cultivar (Tabela 2) como o anão verde que apresentou cinco espécies exclusivas e o híbrido PB121 com 10 espécies exclusivas. Contudo os táxons que foram exclusivos foram isolados poucas vezes, o que dificulta afirmar que existe especificidade com relação as diferentes cultivares. Mariano *et al.* (1997) também trabalhando com cultivares de *Cocos nucifera* fizeram semelhante observação onde espécies muito frequentes não foram específicas a nenhuma cultivar.

O índice de similaridade de Sorensen foi baixo (21,81%) entre as cultivares e o híbrido, uma vez que estudos com hospedeiros de espécies diferentes mostram similaridade em torno de 60% (Arnold *et al.*, 2001).

Trinta e oito espécies de fungos foram isoladas neste estudo. Em comparação com outros trabalhos esse número é relativamente alto, uma vez que Loro *et al.*, (2012) trabalhando com 48

plantas, obtiveram 2 a 8 isolados morfológicamente distintos para cada hospedeiro. Gamboa e Bayman (2001), ao trabalhar com *Guarea guidonia* (L.) Sleumer, obtiveram 38 morfoespécies de endófitos. Em 18 plantas medicinais foram identificados 29 táxons (Selim *et al.*, 2011) e 11 morfoespécies em *Trichilia elegans* A.Juss. (Garcia *et al.*, 2012). Em estudos com fungos endofíticos relacionados com palmeiras um alto número de espécies foi observado por Taylor *et al.*, (1999). Esses autores mencionaram 75 táxons de fungos como endófitos de *Trachycarpus fortunei* (Hook.) H.Wendl coletado em três países. Outros trabalhos relatam menor número de morfoespécie em determinados hospedeiros, como 12 em *Licuala ramsayi* F.Muell (Rodrigues & Samuels, 1990).

Diferenças entre as cultivares assim como no híbrido PB121 foram observadas nos índices ecológicos. O híbrido PB121 apresentou maiores índices ($H' = 2,131$; $D = 4,066$) seguido da cultivar Anão verde ($H' = 1,978$; $D = 3,455$) e Anão amarelo ($H' = 1,709$; $D = 2,759$). As principais diferenças entre o Híbrido PB121 em relação aos outras cultivares está em seu tamanho, cerca de 10m maior que o Anão amarelo e 20m maior que o Anão verde, seus folíolos também apresentam maior consistência. Porém, tais índices estão de acordo com outros trabalhos, onde foi observada variação do índice H' entre 1,5 e 3,5 (Gazis & Chaverri, 2010; Fenghui *et al.*, 2012). Loro *et al.* (2012) encontraram valores de H' entre 2.27 à 3.06 em gramíneas na Venezuela e Bezerra *et al.* (2013) encontraram valores de $H' = 2.991$ em Cactaceae no Nordeste do Brasil.

Registros de índices ecológicos para fungos endofíticos ocorrendo em espécies de palmeiras (Arecaceae) são escassos, no entanto Fröhlich & Hyde (1999) trabalhando com essas plantas concluíram que o número de espécies de endofíticos (Ascomycota, Basidiomycota e anamórficos) que ocorrem em Arecaceae é alto, seguindo a razão 1:26 (palmeira:fungo), sendo mais elevada do que a razão geralmente aceita de 1:6 para outras plantas. Esse fato sugere que essa seria uma estimativa mais precisa da relação de espécies hospedeiro-específicas de fungos para palmeiras nos trópicos e que a estimativa realizada por Hawksworth (1991) de 1,5 milhões de espécies de fungos existentes no planeta seria muito conservadora.

Não houve diferença significativa em relação aos períodos chuvosos e de estiagem com relação a comunidade fúngica, mesmo havendo diferença na precipitação entre as estações. Petrini *et al.* (2000) não observaram diferença na comunidade endofítica entre os períodos no qual foram coletados. Entretanto, em estudos com palmeiras, diferenças significativas foram observadas, sendo a maior ocorrência de fungos endofíticos na estação úmida e menor na seca (Lumyong *et al.*, 2009).

Além da identificação morfológica também foram observados o percentual de identidade máxima das sequências e foram realizadas análises filogenéticas com as sequências obtidas. Apesar de existirem vários trabalhos com análises moleculares (Márquez *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009; Premalatha & Kalra, 2013; Kusari *et al.*, 2013) e alguns com análises morfológicas e moleculares

(Unterseher & Schnittler 2010; García *et al.*, 2013), apenas um trabalho foi realizado para fungos endofíticos em membros da família Arecaceae (Guo *et al.*, 2000).

Arthrinium é comumente encontrado como endofítico (Márquez *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010; Benerjee, 2011; Wachowska *et al.*, 2013) mas também foi relatado como patógeno em humanos (Rai, 1989). Recentemente uma nova espécie, *Arthrinium jatrophae*, foi descrita como endofítica de *Jatropha podagrica* L. (Sharma *et al.*, 2014). Varvas *et al.* (2013) além de isolarem a forma anamórfica, também isolaram sua forma perfeita: *Apiospora*. O isolado obtido neste estudo foi identificado como *Arthrinium xenocordella*. Essa espécie foi recentemente descrita e seu tipo foi isolado de solo. Segundo a descrição original, *A. xenocordella* se assemelha morfológicamente com *A. phaeospermum* (Crous *et al.*, 2013). Devido a essa semelhança a identificação foi possível principalmente devido as análises filogenéticas onde as sequências do nosso isolado formaram um clado com as sequências depositadas no Genbank provenientes da espécie tipo. Esta é a primeira citação de *Arthrinium xenocordella* como endofítico e a primeira referência para o Brasil.

Ascotricha chartarum e seu anamorfo *Dycima* foram isolados como endofítico de raízes de espécies de mangue na Índia (Ananda & Sridhar 2002). Essa mesma espécie de fungo foi isolada como endofítica de folhas de *Ficus* L. no nordeste da Tailândia (Wang *et al.*, 2008). O gênero *Ascotricha* tem sido encontrado como micoparasita (Tavares *et al.*, 2004) não sendo comumente encontrado como endofítico, entretanto alguns trabalhos tem relatado a presença desse fungo em alguns hospedeiros. O isolado AA8 apresentou tanto a fase anamorfa quanto a teleomorfa. Esse fungo agrupou-se com sequências de *Hansfordia sinuosae* na análise filogenética, o que leva a crer que é possível que *Hansfordia* seja um anamorfo de *Ascotricha*. Morfológicamente o isolado AA8 apresentou todas as características (na fase teleomorfa) de *Aschotrica guamensis*, enquanto seu anamorfo foi caracterizado como *Dycima*. O gênero *Hansfordia* foi estabelecido por Hughes (1951), no entanto Von Arx (1982) considera este gênero como sinônimo de *Dicyma*. Em 2011, Cheng *et al.* separaram os dois gêneros devido a presença de células de separação presente em *Hansfordia* e ausente em *Dycima*. Além disso, eles descreveram uma nova espécie (*Hansfordia sinuosae*). Até o momento nenhuma sequência da região ITS de *Ascotricha* foi gerada, apenas sequências da região 18S do rDNA, a qual é muito conservada e utilizada principalmente com intuito de posicionamento de grupos em níveis taxonomicos superiores (Okane *et al.*, 2001). Nas análises filogenéticas fica claro que *Hansfordia* e *Dycima* estão intimamente relacionadas e que o isolado AA8 (*A. guamenses*) está fortemente agrupado com *H. sinuosae*, o que indica que os gêneros *Dycima* e *Hansfordia* podem ser sinônimos.

Aureobasidium pullulans é comumente encontrado como endofítico em regiões tropicais (Costa *et al.*, 2012). *A. pullulans*, além de ser uma espécie aplicada no controle biológico, foi encontrada com alta frequência como endofítico de folhas de uva sob cultivo orgânico (Schmid *et*

al., 2011). *Aureobasidium pullulans* também foi encontrada como endofítico em *Acer pseudoplatanus* L. (Pugh & Buckley, 1971), *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. (Espinosa-Garcia & Langenheim, 1990), *Eucalyptus globulus* Labill. (Bettucci & Saravay, 1993), *Crataegus monogyna* Jacq. (Schulz *et al.*, 1993), *Musa acuminata* Colla (Cao *et al.*, 2001), *Plumeria rubra* L. (Suryanarayanan & Thennarasan (2004), cactos no Arizona (Suryanarayanan *et al.*, 2005), *Ammophila arenaria* (L.) Link e *Elymus farctus* (Viv.) Runemark ex Melderis (Márquez *et al.*, 2008), *Artemisia capillaris* Thumb. (Huang *et al.*, 2009), *Holcus lanatus* L. (Márquez *et al.*, 2010), *Populus tremula* L. (Albrechtsen *et al.*, 2010), *Vitis vinifera* L. (González & Tello, 2011), cana-de-açúcar (Shrestha *et al.*, 2011), *Phleum pratense* L. (Varvas *et al.*, 2013) além de famílias como Orchidaceae (Chen *et al.*, 2011) e Cactaceae (Bezerra *et al.*, 2013).

Cladosporium é um fungo habitante de superfície foliar e interior de folhas jovens e maduras (Sadaka & Ponge, 2003). É um gênero comumente encontrado como endofítico, ocorrendo em diferentes hospedeiros: *Ficus* L. (Wang *et al.*, 2008), *Acer saccharum* Marsh. (Vujanovic & Brisson, 2002), *Vitis vinifera* (González & Tello 2011; Pancher *et al.*, 2012), *Cereus jamacaru* DC. (Bezerra *et al.*, 2013), cactos Suryanarayanan *et al.*, 2005), *Plumeria rubra* (Suryanarayanan & Thennarasan, 2004), *Miscanthus Andersson* (Shrestha *et al.*, 2011), *Sambucus nigra* L. e *Vaccinium oxycoccus* L. (Schulz *et al.*, 1993), *Aquilaria malaccensis* Lamk. (Premalatha & Kalra, 2013), *Holcus lanatus* L. (Márquez *et al.*, 2010), *Ammophila arenaria* e *Elymus farctus* (Márquez *et al.*, 2008), *Vigna unguiculata* (L.), Walp. (Rodrigues & Menezes, 2002), *Paspalum ligulare* Nees, *Bothriochloa pertusa* (L.) A.Camus e *Chloris inflata* Link (Loro *et al.*, 2012), *Hevea brasiliensis* Müll.Arg. (Gazis & Chaverri, 2010), *Ginkgo biloba* (Xiao *et al.*, 2013), *Oryza granulata* Nees et Arn. ex Watt (Yuan *et al.*, 2011), *Eucalyptus nitens* (Fisher *et al.*, 1993), *Musa acuminata* H.Deane & Maiden (Cao *et al.*, 2001), *Stryphnodendron adstringens* Mart. (Carvalho *et al.*, 2012), *Thysanolaena latifolia* (Roxb. ex Hornem.) Honda e *Saccharum spontaneum* L. (Bhilabutra *et al.*, 2010), *Ocimum sanctum* Linn. e *Sapindus detergens* Roxb., Hort. Beng. (Bhagat *et al.*, 2012), *Malus domestica* Borkh (Camatti-Sartori *et al.*, 2005) e *Populus tremula* (Albrechtsen *et al.*, 2010). Em palmeiras tem sido isolados de *Trachycarpus fortunei* (Taylor *et al.*, 1999), *Calamus kerrianus* Becc. (Lumyong *et al.*, 2009), *Livistona chinensis* (Guo *et al.*, 2000). Em *Cocos nucifera* foi o gênero mais isolado como endofítico (Mariano *et al.*, 1997).

Cladosporium cladosporioides é considerado um complexo com cerca de 38 espécies (Bensch *et al.*, 2012) de difícil diferenciação morfológica e molecular. No presente estudo foram obtidos seis isolados que foram identificados como *C. cladosporioides* e todos agruparam com sequências de *C. cladosporioides* presentes no banco de dados. Como utilizamos apenas a região ITS do rDNA e se faz necessário a utilização de vários genes para a identificação de *C. cladosporioides*, resolvemos utilizar o termo Complexo. *Cladosporium cladosporioides* é uma

espécie atuante na decomposição da matéria orgânica (Ellis, 1976; Samson *et al.*, 2000) e tem sido isolada de diversos vegetais como endófito: folhas de *Heliconia* spp. (Pereira, 1993), *Coffea arabica* L. (Santamaría & Bayman 2005), dentre outros. Outro fungo deste gênero isolado das folhas de *C. nucifera* foi *C. dominicanum*. Essa espécie é de comum ocorrência em ambientes hipersalinos (Zalar *et al.*, 2007) e está sendo citada pela primeira vez como endofítico.

Curvularia geniculata (= *Cochliobolus geniculatus*) tem sido relatada como endófito em *Zingiber officinale* Roscoe (Ginting *et al.*, 2013), *Kigelia pinnata* (Jacq.) DC. (Maheswari & Rajagopal, 2013) e *Saccharum spontaneum* L. (Bhilabutra *et al.*, 2010). No presente trabalho apenas a fase anamorfa desse fungo foi observada. Normalmente o gênero *Curvularia* apresenta espécies sapróbias ou fitopatógenas, sendo isolada do ar, plantas e animais (Freire *et al.*, 1998). Outros trabalhos também têm relatado táxons de *Curvularia* isolados como endofíticos tais como: *Curvularia eragrostidis* em *Tapeinochilus ananassae* Hassk (Furtado *et al.*, 2007), *Curvularia lunata* em *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. (yacón) (Gallo *et al.*, 2007), *C. pallescens* em bromeliáceas (Petrini & Dreyfuss, 1981), *Rhizophora* L. (Kumaresan & Suryanarayanan, 2001; Kumaresan & Suryanarayanan, 2002) e caupí (Rodrigues & Menezes, 2002).

Phomopsis (= *Diaporthe*) é comumente isolado como endofítico em diversos hospedeiros, principalmente em regiões tropicais (Costa *et al.*, 2012). Em palmeiras, Rodrigues & Samuels (1990) isolaram representantes desse gênero na região da nervura central de folhas de *Licuala ramsayi*, sem, no entanto, encontrar o fungo na região dos vasos condutores. Espécies desse gênero foram encontradas apenas em folhas, não aparecendo na raque. Rodrigues (1994) observou isolados de *Phomopsis* em folhas do hospedeiro *E. oleraceae*, enquanto Guo *et al.* (2000) relatou representantes do gênero em folhas de *L. chinensis*. *Phomopsis* também foi isolado como endofítico em *Cocos nucifera* por Mariano *et al.* (1997).

Fusarium tem ampla distribuição geográfica (Ventura & Costa, 2006) e tem sido reportado como toxigênico (Bottalico & Perrone, 2002), causando doenças em humanos e principalmente em plantas economicamente importantes (Bottalico, 1998). Como endofítico é comumente isolado em hospedeiros de ambientes tropicais (Costa *et al.*, 2012). Em palmeiras, táxons de *Fusarium* tem sido comumente isolados porém em alguns trabalhos esses fungos são identificados apenas em nível genérico (Rodrigues, 1991; Frohlich *et al.*, 2000). *Fusarium proliferatum* foi relatado como endofítico em ápices caulinares de pupunheira (Almeida *et al.*, 2005) e *F. solani* em *Licuala ramsayi* (Rodrigues & Samuels, 1990) e *Trachycarpus fortunei* (Taylor *et al.*, 1999). Em *Cocos nucifera* apenas *F. oxysporum* e *F. semitectum* foram reportados como endófitos até o momento (Mariano *et al.*, 1997). O presente trabalho relata a primeira ocorrência de *F. proliferatum* e *F. solani* como endofíticos em *C. nucifera*.

Guignardia apresenta-se como sapróbio ou semiparasita de folhas (Sivanesen, 1984), mas tem sido isolado como endofítico em vários vegetais (Corrêa, 2008; Petrini & Dreyfuss, 1981; Araújo *et al.*, 2001; Durán *et al.*, 2005; Photita *et al.*, 2001; Freire & Bezerra, 2001; Rodrigues *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Gazis & Chaverri, 2010; Carvalho *et al.*, 2012; Sawmya *et al.*, 2013). A maioria das espécies de *Guignardia* isoladas como endofítico são referidas como *G. mangiferae*. Segundo Glienke *et al.*, (2011) esses isolados estão identificados erroneamente. Mesmo não tendo utilizado a espécie tipo, os autores afirmam que *G. mangiferae* ocorre apenas causando doenças em *Mangifera indica* L. e que todos os isolados endofíticos em diferentes hospedeiros são na verdade *Phyllosticta capitalensis*. Para Kirk & Cooper (2005) o nome correto para os fungos endofíticos referidos como *G. mangifera* é *P. capitalensis*.

Nigrospora oryzae (= *Khuskia oryzae*) é um fungo comumente isolado como endofítico de *Rhizophora* L. (Suryanarayanan *et al.*, 1998), *Viscum album* L. (Persoh *et al.*, 2010), *Aegle marmelos* (L.) Corr.Serr. (Gond *et al.*, 2007), *Dactylis glomerata* L. (Márquez *et al.*, 2007), *Cereus jamacaru* (Bezerra *et al.*, 2013), Cactos (Suryanarayanan *et al.*, 2005), *Plumeria rubra* L. (Suryanarayanan & Thennarasan 2004), *Mangifera indica* (Johnson *et al.*, 1992), *Anacardium* (Freire & Bezerra, 2001) *Annona* L. (Silva *et al.*, 2006) entre outros. Em palmeiras foi isolada em *Licuala* sp. (Fröhlich *et al.*, 1999) *Euterpe oleracea* (Rodrigues 1994) *Trachycarpus fortunei* (Taylor *et al.*, 2000) e *Cocos nucifera* (Mariano *et al.*, 1997).

Lasiodiplodia theobromae foi a única espécie isolada conhecida como fitopatógeno causando a queima das folhas em *Cocos nucifera*. Mariano *et al.* (1997) também reportaram a ocorrência dessa espécie como endofítica em *C. nucifera*.

Nectria pseudotrichia é pouco conhecida, ocorrendo como endofítica apenas em *Taxus globosa* Schltdl. (Soca-Chafre *et al.*, 2011). Esse trabalho relata a primeira ocorrência de *N. pseudotrichia* como endofítico em palmeiras.

Neosartorya tem sido reportado em solo, suco de frutas e do ar (Samson *et al.*, 2007), e também como patógeno em humanos causando aspergilose cerebral (Guarro *et al.*, 2002; Mellado *et al.*, 2006; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). Trata-se da primeira ocorrência de *N. hiratsuka* como endofítico.

Phlyctaeniella ocorre como epifítico de folhas e em madeiras na Áustria, Austrália, EUA e Índia (Tiwari *et al.*, 2012). Espécies desse gênero não apresentam sequências no GenBank não sendo possível identificar o isolado por meio da biologia molecular. Com base em análises morfológicas trata-se de uma nova espécie para *Phlyctaeniella* e a primeira ocorrência do gênero como endofítico e para o Brasil.

Paecilomyces lilacinus (= *Purpureocillium lilacinus*) é considerado uma espécie sapróbia capaz de utilizar grande faixa de substratos e parasitar vários hospedeiros (Goettel *et al.*, 2001).

Ocorre predominantemente no solo (Jatala, 1986) no entanto é capaz de colonizar endofiticamente raízes (Nunes, 2008; Cao *et al.*, 2002; Lopez-Lorca *et al.*, 2002) e folhas de *Camptotheca acuminata* Decne. (Lin *et al.*, 2007) *Cannabis sativa* (Kusari *et al.*, 2012) *Cereus jamacaru* (Bezerra *et al.*, 2013). Trata-se da primeira ocorrência de *P. lilacinum* como endofítico em *Cocos nucifera*.

Pyrenochaetopsis foi recentemente criado por Gruyter *et al.*, (2010). Há poucos relatos de ocorrência do gênero como endofítico. *P. microspora* foi isolada como endofítica em *Acacia nilotica* (Ahsanul 2012). Trata-se da primeira ocorrência de *Pyrenochaetopsis decipiens* e *P. leptospora* como endofíticas.

Ramichloridium apiculatum foi isolado como endofítico em *Oryza granulata* (Yuan *et al.*, 2011), *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (Angelini *et al.*, 2012) e em *Orchidiaceae* (Petrini & Dreyfuss 1981). Trata-se da primeira ocorrência de *R. apiculatum* como endofítico em palmeiras.

Acremonium strictum (= *Sarocladium strictum*) tem sido isolado como endofítico em plantas medicinais egípcias (Selim *et al.*, 2011). Trata-se da primeira ocorrência de *S. strictum* como endofítico em *Cocos nucifera*.

Sordaria fimicola tem sido isolada em *Quercus ilex* (Fisher *et al.*, 1994), *Pinus halepensis* (Botella & Diez 2011), *Fagus sylvatica* (Unterseher & Schnittler 2010), *Arabidopsis thaliana* (García *et al.*, 2013), *Stryphnodendron adstringens* (Carvalho *et al.*, 2012), *Holcus lanatus* L. (Márquez *et al.*, 2010) e *Populus tremula* L. (Albrechtsen *et al.*, 2010). Trata-se da primeira ocorrência de *S. fimicola* como endofítico em palmeiras.

Syncephalastrum é um gênero reportado como endófito de *Theobroma cacao* L. (Rubini *et al.*, 2005) e *Zea mays* L. (Pimentel *et al.*, 2002).

Xylaria é comumente isolado como endofítico de regiões tropicais (Costa *et al.*, 2012), sendo de difícil identificação em nível específico devido a demora na esporulação em meio de cultura (Davis *et al.*, 2003). Em palmeiras *Xylaria* tem sido isolada de *Trachycarpus fortunei* (Taylor *et al.*, 1999), *Licuala ramsayi* (Rodrigues & Samuels 1990), *Calamus kerrianus* e *Wallichia caryotoides* (Lumyong *et al.*, 2009), *Livistona chinensis* (Guo *et al.*, 2000), *Licuala ramsayi* e *Licuala* sp. (Frohlich *et al.*, 2000) e *Cocos nucifera* (Mariano *et al.*, 1997).

Stenella musae foi descrita recentemente como anamorfo de *Mycosphaerella* (Arzanlou *et al.*, 2008), no entanto, devido a estudos filogenéticos, observou-se que *Mycosphaerella* seria polifilético e algumas espécies foram transferidas como *Stenella musae* para *Zasmidium musae* (Braun *et al.*, 2010). Não existem relatos da ocorrência dessa espécie como endofítico. Entretanto, *S. musae* foi a espécie mais isolada neste estudo.

Leveduras endofíticas são de difícil identificação em nível de espécie (Lima 2010). Foram isoladas algumas leveduras e após análises moleculares foram identificadas como *Pseudozyma hubeiensis*, *Rhodotorula marina* e *Occultifur externus*. Devido a dificuldade em isolar leveduras endofíticas, o fato de obter três espécies para um único hospedeiro mostra-se um dado importante. Essas são as primeiras ocorrências de leveduras como endofíticos em espécies de palmeiras.

Isolados não esporulantes são um problema, estes isolados não podem ser identificados por técnicas morfológicas tradicionais (Guo *et al.*, 2000). Neste estudo foram obtidos alguns isolados que permaneceram como *Mycelia sterilia*. Foram realizadas análises moleculares que permitiram a identificação dos isolados AA89 como *Alternaria alternata*, AV125 como *Cercospora apii* e PB147 como *Fusarium solani*.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do isolamento de fungos endofíticos de folhas sadias de *Cocos nucifera* permitem concluir que:

- *Nigrospora oryzae*, *Pestalotiopsis microspora* e *Stenella musae* destacaram-se como isolados mais frequentes como endofíticos em *Cocos nucifera*;

- Nenhuma diferença significativa com relação a ocorrência de fungos endofíticos foi observada em relação aos períodos chuvosos e de estiagem;

- Entre as cultivares e o Híbrido PB121 a similaridade pelo índice de Sorensen foi baixa;

- *Arthrinium xenocordella*, *Ascotricha guamenses*, *Phlyctaeniella*, *Pyrenochaetopsis decipiens*, *P. leptospora* e *Stenella musae* são citadas pela primeira vez como endofíticos;

- *Fusarium proliferatum*, *F. solani*, *Paecilomyces lilacinus* foram encontrados pela primeira vez como endofíticos em *Cocos nucifera*;

- *Nectria pseudotrichia*, *Ramichloridium apiculatum*, *Sordaria fimicola*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Rhodotorula marina* e *Occultifur externus* são citadas pela primeira vez como endofíticos em palmeiras;

- *Arthrinium xenocordella* e *Phlyctaeniella* são citadas pela primeira vez no Brasil;

- A análise molecular dos fungos a partir da obtenção de sequencias para comparação com o banco de dados do NCBI e construção de árvores filogenéticas contribuíram significativamente para a identificação dos táxons encontrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrechtsen, B.R., Bjorken, L., Varad, A., Hagner, A., Wedin, M., Karlsson, J., Jansson, S. 2010. Endophytic fungi in European aspen (*Populus tremula*) leaves diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance. *Fungal Divers.* 41: 17-28.
- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L. 2008. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1244-1251.
- Almeida, C.V., Yara, R., Almeida, M. 2005. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras.* 40: 467-470.
- Ananda, K., Sridhar, K. 2002. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Can J Microbiol* 48: 871-878.
- Angelini, P., Rubini, A., Gigante, D., Reale, L., Pagiotti, R., Venanzoni, R. 2012. The endophytic fungi communities associated with the leaves and roots of the common reed (*Phragmites australis*) in lake Trasimeno (Perugia, Italy) in declining and healthy stands. *Fungal Ecol.* 5: 683-693.
- Aragão, W. M.; Ribeiro, F. E.; Tupinambá, E. A.; Siqueira, E. R. de. Variedades e híbridos do coqueiro. In: Aragão, W. M. (Ed.). Coco pós-colheita. Brasília: EMBRAPA, 2002. p. 26-34. (Série Frutas do Brasil, 29).
- Aragão, W.M.; Siqueira, E.R. de; Ribeiro, F.E.; Tupinambá, E.A. Melhoramento do coqueiro e híbridos. In: São José, A.R.; Souza, I.V.B.; Moura, J.I.L.; Rebouças, T.N.H. (Ed.) Coco produção e mercado. Vitória da Conquista, DFZ/UESB, 1999. p. 44-68.
- Araújo, W.L. Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros. Dissertação de Mestrado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo, 1996.
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research* 105 (12): 1502-1507.
- Arzanlou, M., Khodaei, S. 2012. *Aureobasidium iranianum*, a new species on bamboo from Iran. *Mycosphere* 3: 404-408.
- Azevedo, J.L., Araujo, W.L., 2007. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli BN, Deshmukh SK (eds), Multifaceted microbes. CRC press, Boca Raton 189-207.
- Azevedo, J.L., Maccheroni Júnior, 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.
- Bacon, C.W., White Jr., J.F. 2000. Microbial endophytes. New York, Marcel Dekker. pp. 487.
- Banerjee, D. 2011. Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. *Res. J. Microbiol* 6: 54-62.

- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72: 1-401.
- Bensch, K., Groenewald, J.Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Shin, H.-D., Dugan, F.M., Schroers, H.-J., Braun, U., Crous, P.W. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology* 67: 1-94.
- Bettucci, L., Saravay, M. 1993. Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: A preliminary study. *Mycological Research* 97: 679-682.
- Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Barbosa, R.N., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J.S., Gomes, B.S., Paiva, L.M., Almeida-Cortez, J.S., Souza-Motta, C.M. 2013. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Sis.* 60: 53-63.
- Bhagat, J., Kaur, A., Sharma, M., Saxena, A.K., Chadha, B.S. 2012. Molecular and functional characterization of endophytic fungi from traditional medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 963-971.
- Bhilabutra, W., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., Lumyong, S. 2010. Fungi on the grasses, *Thysanolaena latifolia* and *Saccharum spontaneum*, in northern Thailand. *Mycosphere* 1 (4): 301-314.
- Botella, L., Diez, J.J. 2011. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Divers.* 47: 9-18.
- Bottalico, A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxins profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80: 85-103.
- Bottalico, A., Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 611-624.
- Braun, U., Crous, P.W., Schubert, K., Shin, H. D. 2010. Some reallocations of *Stenella* species to *Zasmidium*. *Schlechtendalia* 20: 99-104.
- Camatti-Sartori, V., da Silva-Ribeiro, R.T., Valdebenito-Sanhueza, R.M., Pagnocca, F. C., Echeverrigaray, S., Azevedo, J.L. 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *J. Basic Microbiol.* 45: 397-402.
- Cao, L.X., You, J.L., Zhou, S.N. 2002. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in south China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 169-171.
- Carroll, G.C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2-9.
- Carvalho, C.R., Goncalves, V.N., Pereira, C.B., Johann, S., Galliza, I.V., Alves, T.M.A., Rabello, A., Sobral, M.E.G., Zani, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H. 2012. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis* 57 (2): 95-107.

- CGIAR. Coconut (*cocos nucifera*). Disponível em <<http://www.cgiar.org>>. Acesso em janeiro de 2014.
- Chen, J., Hu, K.X., Hou, X.Q., Guo, S.X. 2011. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1009-1016.
- Chen, J., Xing, X.K., Zhang, L.C., Xing, Y.M., Guo, S.X. 2012. Identification of *Hortaea werneckii* isolated from mangrove plant *Aegiceras comiculatum* based on morphology and rDNA sequences. *Mycopathologia* 174: 457-466.
- Cheng, X.L., Sun, K.M., Li, W., Zhang, T.Y., Li, C.L. A new species of *Hansfordia* isolated from the marine brown alga, *Colpomenia sinuosa*. *Mycotaxon* 116: 431-436.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plant and fungi. *Ecology* 69: 2-9.
- Clake, K.R., Gorley, R.N. 2006. Primer v.6 User Manual\Tutorial. Primer-E Ltd, Plymouth. 75.
- Corrêa, A.S. 2008. Avaliação da microbiota endofítica de citros com potencial antagônico no controle biológico de *Guignardia citricarpa*. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 57p.
- Costa, I.P.M.W., Assunção, M.M.C., Lima, T.E.F., Oliveira, R.J.V., Cavalcanti, M.A.Q. 2012. Checklist of endophytic fungi from tropical regions. *Mycotaxon*. 119: 493-494.
- Crous, P.W., Groenewald, J.Z. 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrrium*. *IMA Fungus* 4 (1): 133-154.
- Cuenca, M.A.G. Importância econômica do coqueiro. In: Ferreira, J.M.S.; Warwick, D.R.N.; Siqueira, L.A. (Ed.). A cultura do coqueiro no Brasil. 2. ed. Aracaju: Embrapa-SPI, 1998. pp. 17-56.
- Cui, J.L., Guo, S.X., Xiao, P.G. 2011. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. *J Zhejiang Univ Sci B* 12: 385-392.
- de Gruyter, J.D., Woudenberg, J.H., Aveskamp, M.M., Verkley, G.J., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2010. Systematic reappraisal of species in Phomasection Paraphoma, Pyrenochaeta and Pleurophoma. *Mycologia* 102: 1066-1081.
- Durán, L.E., Ploper, D., Ramalho, J.C., Grandi, R.A.P., Giancoli, A.C.H., Azevedo, J.L. 2005. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. *Canadian Journal of Botany* 83 (4): 350-335.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew. England. 608p.
- Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew. England. 507p.

- Embrapa. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional -Panorama 2010. Acesso em 15 Junho 2011.
- Embrapa. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional -Panorama 2010. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/doc_164.pdf>. Acesso em: 31 maio 2012.
- Espinosa-Garcia, F.J., Langenheim, J.H. 1990. The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population - diversity and spatial patterns. *New Phytologist* 116: 89-97.
- Fidalgo, O., Fidalgo, M.E. 1967. Dicionário Micológico. Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.
- Fisher, 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 Phytologist* 127: 133-137.
- Foale, M.; Harries, H. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Coconut (*Cocos nucifera*). In: Elevitch C.R. (ed) 2011. Specialty crops for Pacific Islands. Permanent Agriculture Resources, Holualoa.
- Freire, F.C.O. 2005. An updated list of plant fungi from Ceará State (Brazil) - I Hyphomycetes. *Revista Ciência Agronômica* 36: 364-370.
- Freire, F.C.O., Bezerra, J.L. 2001. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. *Summa Phytopathologica* 27 (3): 304-308.
- Fröhlich, J., Hyde, K.D. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodivers. Conserv.* 8: 977-1004.
- Frohlich, J., Hyde, K.D., Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104: 1202-1212.
- GamboaGaitan, M.A. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana* 11: 10-12.
- Garcia, E., Alonso, A., Platas, G., Sacristan, S. 2013. The endophytic mycobiota of *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Divers.* 60: 71-89.
- Gazis, R., Chaverri, P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecol.* 3: 240-254.
- Ginting, R.C.B., Sukarno, N., Widyastuti, U., Darusman, L.K., Kanaya, S. 2013. Diversity of endophytic fungi from red ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) plant and their inhibitory effect to *Fusarium oxysporum* plant pathogenic fungi. *HAYATI Journal of Biosciences* 20 (3): 127-137.
- Glienke, C., Pereira, O., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunnington, J., Shivas, R., Groenewald, J., Crous, P.W. 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia* 26 (1): 47-56.

- Góes-Neto, A., Loguerio-Leite, C., Guerrero, R.T. 2005. DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas*. 18: 19-32.
- Gomes, R.P. 1984. O coqueiro-da-baía. 5. ed. São Paulo: Nobel, pp. 111.
- Gómez-Vidal, S., Lopez-Llorca, L.V., Jansson, H.B., Salinas, J. 2006. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron*. 37: 624-632.
- Gómez-Vidal, S., Salinas, J., Tena, M., Lopez-Llorca, L.V. 2009. Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. *Electrophoresis* 30: 2996-3005.
- Gond, S.K., Verma, V.C., Kumar, A., Kumar, V., Kharwar, R.N. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1371-1375.
- González, V., Tello, M.L. 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Divers.* 47: 29-42.
- Guarro, J., Kallas, E.G., Godoy, P., Karenina, A., Gene, J., Stchigel, A., Colombo, A.L. 2002. Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 8: 989-991.
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *System. Biol.* 52 (5): 696-704.
- Guo, L.D., Hyde, K.D., Liew, E.C.Y. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* 147: 617-630.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Haque, A., Galea, V., Goulter, K., Bissett, A., van Klinken, R.D. 2012. A preliminary investigation of prickly acacia dieback (*Acacia nilotica* ssp. indica). *Eighteenth Australasian Weeds Conference*. 131-134.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95: 641-655.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Surveswaran, S., Hyde, K.D., Corke, H. and Sun, M. 2009. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity* 36: 69-88.
- Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z., Su, W. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31: 163-167.
- Hughes, S.J. 1951. Studies on micro-fungi. IX. *Calcarisporium*, *Verticicladium*, and *Hansfordia* (gen. nov.). *Mycological Papers* 43: 25.

- IBGE. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisa>>. Acesso em: 12 dez. 2010.
- Johnson, G.I., Mead, A.J., Cooke, A.W., Dean, J.R. 1992. Mango stem and rot pathogens – Fruit infection by endophytic colonisation of inflorescence and pedicel. *Annual Applied Biology* 120: 225-234.
- Khan, S.A., Hamayun, M., Kim, H., Yoon, H., Seo, J., Choo, Y., Lee, I., Kim, S., Rhee, I., Kim, J. 2009. A new strain of *Arthrinium phaeospermum* isolated from *Carex kobomugi* Ohwi is capable of gibberellin production. *Biotechnol. Lett.* 31: 283-287.
- Kjer, J., Wray, V., Edrada-Ebel, R., Ebel, R., Pretsch, A., Lin, W., Proksch, P. 2009. Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria* sp. isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. *Journal of Natural products* (30): 20.
- Kogel, K.H., Franken, P., Hüchelhoven, R. 2006. Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology* 9: 358-363.
- Koolen, H.H.F., Soares, E.R., Silva, F.M.A., Almeida, R.A., Souza, A.D.L., Medeiros, L.S., Rodrigues Filho, E., Souza, A.Q.L. 2012. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f. *Quim. Nova* 35: 771.
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M., Kayser, O. 2012. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogen. *Fungal Divers.* 60: 137-151.
- Lima, T. F. E. Micobiota endofítica de *Vitis labrusca* L. cv. isabel no vale do siriji, Pernambuco, Brasil. Dissertação de Mestrado, UFPE, Pernambuco, Brasil, 2010.
- Loro, M., Valero-Jiménez, C.A., Nozawa, S., Márquez, L.M. 2012. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *J. Arid. Environ.* 85: 46-55.
- Lumyong, S., Techa, W., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. 2009. Endophytic fungi from *Calamus kerrianus* and *Wallichia caryotoides* (Arecaceae) at Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. *Chiang Mai J. Sci.* 36: 158-167.
- Maheswari, S., Rajagopal, K., 2013. Biodiversity of endophytic fungi in *Kigelia pinnata* during two different seasons. *Curr. Sci.* 104: 515-518.
- Mariano, R.L.R., Lira, R.V.I., Silveira, E.B., Menezes, M. 1997. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no Nordeste do Brasil. I. Frequência da população fúngica e efeito da hospedeira. *Agrotópica* 9: 127–134.
- Maki, C.S. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). Tese de Doutorado. Unidade Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas. Luiz de Queiroz, 2006.
- Medina, J.C. Coco I - Cultura. In: Medina, J.C.; Garcia, J.L. M.; de Martin, Z.J.; Kato, K.; Teruo, P.; Turatti, J.M.; Santos, L.C.; Silva, M.T.C.; Canto, W.L.; Bicudo Neto, L.C.; Moretti, V.A.

(Ed.). Coco da cultura ao processamento e comercialização. São Paulo: ITAL, 1980. pp. 7-172. (Série Frutas Tropicais, 5).

- Mellado, E., Alcazar-Fuoli, L., Garcia-Effro, G., Alastruey-Izquierdo, N.A., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L. 2006. New resistance mechanisms to azole drugs in *Aspergillus fumigatus* and emergence of antifungal drugs-resistant *A. fumigatus* atypical strains. *Medical Mycology* 44: 367-371.
- Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshal, D.F., Husmeier, D., McGuire, G. 2004. TOPALi: Software for automatic identification of recombinant sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics* 20: 1806-1807.
- Neto, P.A.S., Azevedo, J.L., Araújo, W.L. 2003. Microrganismos Endofíticos. Interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 5: 29.
- Nucé de Lamothe, M. 1983. Melhoramento do Coqueiro. Montpellier: IRHO. Relatório da Missão Realizada nas plantações de Embrapa.
- Okane, I., Nakagiri, A., Ito, T. 2001. *Surculiseria rugispora* gen. et sp. nov. a new endophytic mitosporic fungus from leaves of *Bruguiera gymnorhiza*. *Mycosci* 42: 115-122.
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E., Longa, C.M.O., Yousaf, S., Pertot, I., Campisano, A. 2012. Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(12): 4308-4317.
- Pereira, J.O. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. São Paulo, 1993.
- Pereira, J.O., Azevedo, J.L., Petrini, O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. *Mycologia* 85: 362-364.
- Persley, G. P. 1992. Replanting the tree of life: towards an internacional agenda for coconut palm reserch. Wallingford: CAB; ACIAR, pp. 156.
- Peršoh, D., Melcher, M., Flessa, F., Rambold, G. 2010. First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. *austriacum* and its host *Pinus sylvestris*. *Fungal Biol.* 114: 585-596.
- Petrini, O., Dreyfuss, M. 1981. Endophytische Pilze in Epiphytischen Araceae, Bromeliaceae und Orchidaceae. *Sydowia* 38: 216-234.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves*. Springer – Verlag, New York. pp.179-197.
- Premalatha, K., Kalra, A. 2013. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from resinous and healthy wood of *Aquilaria malaccensis*, a red listed and highly exploited medicinal tree. *Fungal Ecology* 6: 205-211.
- Pugh, G.J.F., Buckley, N.G. 1971. *Aureobasidium pullans*: An endophyte in sycamore and other trees. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57 (2): 227-231.

- Purseglove, J.W. 1972. Tropical crops monocotyledons. Lond: Logman, pp. 607.
- Read, J.C., Camp, B.J. 1986. The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance, toxicity and stand maintenance. *Agronomy Journal* 78: 848-850.
- Rhoden, S.A., Garcia, A., Rubim Filho, C.J., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A. 2012. Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). *Genet. Mol. Res.* 11 (3): 2513-2522.
- Rodrigues, K.F., Dias-filho, M.B. 1996. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu* and *B. humidicola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31: 905-909.
- Rodrigues, K.F., Samuels, G.J. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycol. Res.* 94: 827-830.
- Rodrigues, K.F., Sieber, T.N., Grünig, C.R., Holdenrieder, O. 2004. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology ISSR-PCR amplifications and ITS1–5.8S–ITS2 sequences. *Mycol. Res.* 108 (1): 45-52.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19 (12): 1572-1574.
- Sadaka, N., Ponge, J.F. 2003. Fungal colonization of phyllosphere and litter of *Quercus rodundifolia* Lam. in a holm oak forest (High Atlas, Morocco). *Biology and Fertility of Soils* 39 (1): 30-36.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. 2000. Introduction to food-and airborne fungi. 6th edition. Utrecht, The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 387p.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Peterson, S.W., Frisvad, J.C., Varga, J. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology* 59: 147-207.
- Sánchez-Márquez, S., Bills, G.F., Domínguez Acuña, L., Zabalgoceazcoa, I. 2010. Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Divers.* 41: 115-123.
- Sánchez-Márquez, S., Bills, G.F., Zabalgoceazcoa, I. 2007. The endophyte mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Divers.* 27: 171-195.
- Sánchez-Márquez, S., Bills, G.F., Zabalgoceazcoa, I. 2008. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Divers.* 33: 87-100.
- Santamaría, J., Bayman, P. 2005. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* 50: 1-8.
- Saunders, M., Glenn, A.E., Kohn, L.M. 2010. Exploring the evolutionary ecology of fungal endophytes in agricultural systems: using functional traits to reveal mechanisms in community processes. *Evol. Appl.* 3: 525-537.
- Sawmya, K., Vasudevan, T.G., Murali, T.S. 2013. Fungal endophytes from two orchid species – pointer towards organ specificity. *Czech Mycol.* 65 (1): 89-101.

- Schmid, F., Moser, G., Muller, H., Berg, G. 2011. Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (6): 2188-2191.
- Schulz, B., Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- Selim, K.A., El-Beih, A.A., AbdEl-Rahman, T.M., El-Diwany, A.I. 2012. Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 2 (1): 31-82.
- Selim, K.A., El-Beih, A.A., Abdel-Rahman, T.M., El-Diwany, A.I. 2011. Biodiversity and antimicrobial activity of endophytes associated with Egyptian medicinal plants. *Mycosphere* 2: 669-678.
- Sharma, R., Kulkarni, G., Sonawane, M.S., Shouche, Y.S. 2014. A new endophytic species of *Arthrinium* (Apiosporaceae) from *Jatropha podagrica*. *Mycoscience*. 55 (2): 118-123.
- Shrestha, P., Szaro, T.M., Bruns, T.D., Taylor, J.W. 2011. Systematic search for cultivatable fungi that best deconstruct cell walls of *Miscanthus* and sugarcane in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (15): 5490-5504.
- Silva, S.V. Regeneração in vitro de embriões de Cocos nucifera L. Dissertação de Mestrado. Unidade Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Área de concentração Fisiologia e Bioquímica de Plantas. Luiz de Queiroz, 2002.
- Siqueira, E.R. de, Ribeiro, F.E., Aragão, W.M., Tupinambá, E.A. Melhoramento genético do coqueiro. In: Ferreira, J.M.S., Warwick, D.R.N., Siqueira, L.A. (Ed.). A cultura do coqueiro no Brasil. 2 ed. Aracaju: Embrapa-SPI, 1998. pp. 73-98.
- Soca-Chafre, G., Rivera-Orduña, F.N., Hidalgo-Lara, M.E., Hernandez-Rodriguez, C., Marsch, R., Flores-Cotera, L.B. 2011. Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. *Fung. Biol.* 115: 143-156.
- Sorensen, T.A. 1948. A method of establishing of equal amplitud in plant sociology based on similitaty on species content, and its application to analysis of the vegetation on Danish commons. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Biologiske Skrifter* 5: 1-34.
- Southcott, K.A., Johnson, J.A. 1997. Isolation of endophytes from two species of palm from Bermuda. *Can. J. Microbiol.* 43: 789-792.
- Souza, A.Q.L., Souza, A.D.L., Astolfi Filho, S., Belém-Pinheiro, M.L., Sarquis, M.I.M., Pereira, J.O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazônica* 34: 185-195.
- Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P., Bignami, G. 1995. The search for a taxol producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of Natural Products* 58 (9): 1315- 1324.
- Stovall, M.E., Clay, K. 1991. Fungitoxic effects of *Balansia cyperi*. *Mycologia* 83: 288-295.

- 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., 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. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microb. Infect.* 5: 535-544.
- Strobel, G. 2006. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Curr. Opinion Microbiol.* 9: 240-244.
- Strobel, G.A., Hess, W.M., Li, J.Y., Ford, E., Sears, J., Sidhu, R.S., Summerell, B. 1997. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol producing endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal Botany* 45: 1073-1082.
- Strobel, G., Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (4): 491-502.
- Suryanarayanan, T.S., Thennarasan, S. 2004. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity* 15: 197-204.
- Suryanarayanan, T.S., Wittlinger, S.K., Faeth, S.H. 2005. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycol. Res.* 109: 635-639.
- Tavares, E.T., Tigano, M.S., Mello, S.C.M., Martins, I., Cordeiro, C.M.T. 2004. Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. *Fitopatol. Bras.* 29:148-154.
- Taylor, J.E., Hyde, K.D., Jones, E.B.G. 1999. Endophytic associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei* within and outside its natural geographical range. *New Phytologist* 142: 335-346.
- Ting, A.S.Y., Meon, S., Kadir, J., Radu, S., Singh, G. 2008. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *BioControl* 53: 541-553.
- Unterseher, M., Schnittler, M. 2010. Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecol.* 3: 366-378.
- Varvas, T., Kasekamp, K., Kullman, B. 2013. Preliminary study of endophytic fungi in timothy (*Phleum pratense*) in Estonia. *Acta Mycol.* 48 (1): 41-49.
- Von Arx, J.A. 1982. The genus *Dicyma*, its synonyms and related fungi. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Series C* 85: 21-28.
- Vujanovic, V., Brisson, J. 2002. A comparative study of endophytic mycobiota in leaves of *Acer saccharum* in eastern North America. *Mycological Progress* 1 (2): 147-154.
- Wachowska, U., Stasiulewicz-Paluch, A.D., Glowacka, K., Mikolajczyk, W., Kucharska, K. 2012. Response of epiphytes and endophytes isolated from winter wheat grain to biotechnological and fungicidal treatments. *Pol. J. Environ. Stud.* 22 (1): 267-273.

- Wagenaar, M., Corwin, J., Strobel, G.A., Clardy, J. 2000. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungi in the genus *Rhinochrysiella*. *Journal of Natural Products* 63: 1692-1695.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., Von Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 13386-13391.
- Wang, H.K., Hyde, K.D., Soyong, K., Lin, F.C. 2008. Fungal diversity on fallen leaves of *Ficus* in northern Thailand. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9 (10): 835-841.
- Wang, J., Li, G., Lu, H., Zheng, Z., Huang, Y., Su, W. 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS-Microbiology Letters* 193: 249-253.
- West, C.P., Oosterhuis, P.M., Wulschleger, S.D. 1990. Osmotic adjustment in tissues old tall fescue in response to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 30: 149-156.
- Yuan, Z.L., Su, Z.Z., Mao, L.J., Peng, Y.Q., Yang, G.M., Lin, F.C., Zhang, C.L. 2011. Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of *Muscador* (Xylariaceae). *J. Microbiol.* 49 (1): 15–23.
- Yuan, Z.L., Zhang, C.L., Lin, F.C., Kubicek, C.P. 2010. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in rare wild rice roots (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1642-1652.
- Zalar, P., Hoog, G.S. de, Schroers, H.-J., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Gunde-Cimerman, N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology* 58: 157-183.
- 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.
- Zou, W.X., Tan, R.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18: 448-459.